

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Utilização de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N na
identificação de bacalhau *Gadus* e outras espécies de
peixes salgados secos**

Emanuel Joaquim Victória Monteiro Oliveira Lima

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do CAUNESP, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Aquicultura.

JABOTICABAL-SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Utilização de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N na
identificação de bacalhau *Gadus* e outras espécies de
peixes salgados secos**

Emanuel Joaquim Victória Monteiro Oliveira Lima

Orientadora: *Prof.^a. Dr.^a. Léa Silvia Sant'Ana*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura do CAUNESP,
como parte das exigências para a obtenção
do Título de Doutor em Aquicultura.

JABOTICABAL
São Paulo, Brasil
Fevereiro de 2010

L732u Lima, Emanuel Joaquim Victória Monteiro Oliveira
Utilização de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N na identificação de
bacalhau *Gadus* e outras espécies de peixes salgados secos /
Emanuel Joaquim Victória Monteiro Oliveira Lima. -- Jaboticabal,
2010
xi, 59 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2010

Orientadora: Léa Silvia Sant'Ána

Banca examinadora: Carlos Ducatti, Newton Castagnolli, Luiz
Edivaldo Pezzato, Maria Célia Martins de Souza

Bibliografia

1. Bacalhau. 2. Isótopos estáveis. 3. IRMS. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.32:54.027

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA


CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Utilização de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N na identificação de bacalhau *Gadus* e outras espécies de peixes salgados secos

AUTOR: EMANUEL JOAQUIM VICTÓRIA MONTEIRO OLIVEIRA LIMA
ORIENTADORA: Profa. Dra. LEA SILVIA SANTANA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LEA SILVIA SANTANA 
Departamento de Ges e Tecn Agro-Industr / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu

Prof. Dr. CARLOS DUCATTI 
Departamento de Física e Biofísica / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. NEWTON CASTAGNOLLI 
Campus de Jaboticabal-Fcav / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUIZ EDIVALDO PEZZATO 
Departamento de Melhor e Nutri Animal / Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia de Botucatu

Profa. Dra. MARIA CÉLIA MARTINS DE SOUZA
Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo, Instituto de Economia Agrícola, Centro de Estudos Em Administração e Economia da Produção de São Paulo.



Data da realização: 05 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Com grande estima, dedico esta Tese:

Aos meus pais, *Jorge e Margarida,*

lá longe, em Cabo Verde,
pelo amor indescritível,
paciência sem limites,
transmissão de pensamento!

Ao meu irmão & família, *Miguel Jorge, Paula, Luís e Rui,*

mais além, nos Açores,
pela saudade imensa,
a expectativa do reencontro
aquele abraço apertado!

À minha família maravilhosa, *Vivian e Mariana,*

aqui bem perto, no Brasil,
meu porto seguro,
meus amores,
minha vida!

HOMENAGEM

Com esta Tese, homenageio:

○ *Prof. Dr. Newton Castagnolli.*

Se cada qual tem uma missão na Terra,
ele é dos que criam os alicerces, para outros desfrutarem
dos que são movidos a grandes desafios
lunáticos, talvez,
mas que o Mundo não prescinde,
porque deles carece
para novos caminhos desbravar.

○ *Dr. Sérgio Ostini.*

A fonte de conhecimento,
a sabedoria
que dele bebíamos,
hoje,
apenas o vazio da sua ausência,
mas boas lembranças perduram
daquele humor incontido
o espírito aventureiro
a vida intensa de boemia
uma cervejinha ao fim da tarde
a noite,
só podia terminar em filosofia.

OFERECIMENTO

Ofereço esta Tese:

Ao *Liceu "Dr. Teixeira de Sousa"*, em São Filipe, na ilha do Fogo, e seu jovem Diretor, *Luís Nunes*, pela oportunidade de trabalho, a honra de poder servir tão destacada escola, deixar um pouco da minha experiência àquelas crianças maravilhosas, o privilégio de ter vivenciado a simpatia daquele povo acolhedor... mas também, a angústia por ter saído a meio do ano letivo, precisamente para continuar os meus estudos e fazer este doutorado. Por isso, guardo uma dívida de gratidão, que um dia espero saber retribuir.

Aos meus irmãos da Guiné-Bissau, *Có, Elói e Ramiro*, pela amizade inextinguível. Só pode ter continuação... numa cachupada em Cabo Verde ou com bafatório na Guiné!

AGRADECIMENTOS

À *Profa. Dra. Lea Sant'Ana*, por ter aceitado me orientar, mesmo sabendo que tínhamos pouco tempo para desenvolver um projeto e sobretudo coloca-lo em prática. Fico imensamente grato pelo apoio prestado durante estes dois anos de trabalho, sobretudo nesta fase final em que a sua experiência foi decisiva.

Ao estrategista e sempre bem disposto *Prof. Dr. Carlos Ducatti* e sua equipe maravilhosa, nunca medindo esforços para me ajudar nesta ^{13}C caçada aos ^{15}N nicos isótopos estáveis. *Evandro*, incansável, rodando as amostras, vezes sem conta, no IRMS e reproduzindo tudo em gráficos com forma de aranha; *Juliana*, também decisiva, com o SAS e as regiões de confiança; *Cibele*, pelo incondicional apoio em todo o processo, desde a moagem criogênica até à pesagem das amostras naquelas balanças loptcas; *Silvia*, que durante dois anos, sempre com muita paciência, conseguiu aturar as minhas idas e vindas no laboratório. A todos, meus sinceros agradecimentos.

Ao *Eduardo Abimorad* e sua sabedoria, que sempre aparece nos momentos decisivos para me ajudar com bons conselhos, mais uma vez obrigado.

Ao *João*, técnico de laboratório, cujo apoio incomensurável na realização das análises feitas no Lageado, nunca poderei agradecer verdadeiramente.

Às amigas *Carol*, pela amizade e apoio incondicional quando as dúvidas relacionadas com a área de alimentos me atormentavam; e *Raquel*, também pela amizade e apoio incondicional na parte estatística e traduções de inglês.

Ao Prof. Dr. *Gilson Volpato*, que, em apenas dois minutos, abriu a minha cabeça quanto à melhor forma de escrever os artigos.

Ao Prof. Dr. *Waldemar Filho*, que, com os seus conhecimentos, abrilhantou a minha banca de qualificação, juntamente com o Prof. Dr. Carlos Ducatti.

Aos Profs. Drs. *Newton Castagnolli*, *Carlos Ducatti*, *Luiz Edivaldo Pezzato* e *Maria Célia Martins de Souza*, que muito me honraram com a sua presença na minha banca de defesa.

À Prof. Dra. *Irene Vicentini*, pelo apoio em momentos difíceis.

À *Veralice*, que, não sei como, ainda consegue atender às minhas ligações e responder com tranquilidade às constantes dúvidas sobre normas e regulamentos da FCG.

À minha querida *Dani*, que em boa hora me emprestou o seu computador, para que eu pudesse terminar esta tese.

Ao meu primo *João Manuel*, o poliglota, que fala todas as línguas do Mundo, ocidentais ou orientais, pelo apoio nas correções dos resumos de inglês. Muito obrigado!

Também à minha querida *Vivi* que, além de acompanhar o desenrolar dos trabalhos desta tese, ainda me prestou importantíssimo apoio na parte estatística.

Finalmente, ao *Brasil*, através da *CAPES/PEC-PQ*, pela bolsa de estudos que me permitiu fazer este doutorado.

ÍNDICE

	Páginas
PREÂMBULO.....	1
CAPÍTULO I	
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1 OBJETIVOS.....	5
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Os Gadídeos.....	6
2.2 Salga e secagem de peixes.....	7
2.3 Comércio de peixes salgados secos no Brasil e no mundo.....	8
2.4 A qualidade de produtos alimentares.....	9
2.5 Isótopos estáveis.....	10
2.6 A espectrometria de massa de razão isotópica – IRMS.....	11
2.7 Isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N em estudos ecológicos.....	11
2.8 Alguns estudos desenvolvidos no CIE.....	13
2.9 Estudos com bacalhau.....	14
2.10 Referências.....	16
CAPÍTULO II	
REQUISITOS DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA PEIXES SALGADOS E PEIXES SALGADOS E SECOS.....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	25
Resultados.....	25
Discussão.....	27
Conclusões.....	28
Referências.....	29

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES SALGADOS SECOS DA FAMÍLIA <i>GADIDAE</i> ATRAVÉS DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$	32
Resumo.....	32
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	34
Resultados.....	35
Discussão.....	37
Conclusões.....	39
Referências.....	39

CAPÍTULO IV

UTILIZAÇÃO DE $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$ EM TECIDOS DE BAIXA E ALTA ATIVIDADE METABÓLICA NA IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES SALGADOS SECOS.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	45
Resultados.....	47
Discussão.....	50
Conclusões.....	55
Referências.....	55

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
---------------------------	----

ANEXO

BANCO DE DADOS.....	59
---------------------	----

PREÂMBULO

O príncipe dos mares

São mil anos de história! Descoberto pelos Vikings em suas diabólicas aventuras, faria mais tarde o casamento perfeito com sal e sol, pela mão dos bascos, visionários, que assim o transformaram em verdadeiro negócio. Dos portugueses virou o “fiel amigo”, parceiro ideal na época das grandes navegações, a quem alimentou a vida, meses a fio, quando estes saíram por aí fora riscando os mares dos quatro cantos do globo. Valioso, todos queriam arribar às cercanias do Pólo Norte e trocá-lo por ouro. Finalmente, vieram as indústrias norueguesas para internacionalizar definitivamente o produto mais tradicional da face da terra – o bacalhau. “Por favor, mais um bolinho de bacalhau aí, cara!”

O hábito de comer bacalhau ganhou expressão no Brasil com a vinda da corte portuguesa, no início do Séc. XIX. Se um dia, tal iguaria já foi privilégio de intelectuais e gente mais abastada da população, hoje, a culinária brasileira não a dispensa de seus cardápios, desde finos restaurantes a modestos bares e botequins. Nas festividades do Natal e da Páscoa então, quem teria o mau gosto de não levá-lo para casa? Bem distante vai o ano de 1843, quando se verificou a primeira importação oficial brasileira de bacalhau da Noruega.

Nessa época, a Noruega já era, há muito, o grande pólo mundial de exportação de bacalhau. Um poeta norueguês é que definiu bem a sua importância para a economia daquele país. “O que faremos se o bacalhau nos abandonar?” Questionava ele preocupado e concluía, com certa angústia – O que levaremos a Bergen para trocar por ouro?

Quando os bascos tiveram a ideia de salgar o bacalhau e deixá-lo secando ao ar livre, talvez não imaginassem a revolução que isso provocaria na alimentação mundial. É que não podiam ter encontrado peixe mais perfeito para essa atividade. O seu baixo teor de gordura e a alta concentração de proteínas facilitavam aquele processo de conservação. Foi na busca de um produto assim, não perecível, capaz de suportar longas viagens, em época de grandes navegações, que levou os portugueses a adotar o bacalhau. E para pescá-lo, iam até aos confins do mundo.

A pesca do bacalhau era uma autêntica caça ao ouro, em que muitas vidas se perdiam, um ato de heroísmo nas águas geladas do Atlântico Norte. Desde o Séc. XV e por mais de 500 anos, navios portugueses partiam em abril para a mais terrível das missões, nas proximidades da Noruega e da Groenlândia, só regressando em outubro, com os porões repletos de bacalhau. Cada navio levava 40 a 60 barcas de apenas 5 metros de comprimento, todas elas capazes de flutuar com não mais de uma tonelada de pescado. Enquanto o navio permanecia ancorado em algum sítio, os pescadores desapareciam atrás do horizonte, naquelas embarcações minúsculas, nunca se intimidando com nevoeiros, icebergs ou poderosas tempestades. Era um trabalho tremendamente solitário, atenuado apenas pela companhia de uma bússola e um balde de iscas, bem como pão e azeitonas para matar a fome. Linhas com mil anzóis eram lançadas ao mar e chegavam a esperar 20 horas pelo sucesso da pescaria. Finalmente podiam retornar ao navio, mas no dia seguinte, às 4 da manhã, lá estavam eles em busca de mais... e mais!

As grandes frotas mercantis da época tentavam a todo o custo dominar e controlar os locais de pesca do bacalhau. Muitos tratados internacionais foram alinhavados entre as grandes potências, mas algumas "Guerras do Bacalhau" acabavam por ser inevitáveis, como a que opôs ingleses e espanhóis, em 1585. Hoje a guerra é outra e o mundo se une contra a morte anunciada do "príncipe dos mares". De um dia para o outro poderemos ficar apenas com relatos de grandes feitos alcançados por quem teve a glória de contemplá-lo vagando pelo Atlântico. E escritos como o de um certo diário de bordo de uma tal embarcação de pesca em águas escocesas, narrando um inesquecível dia de junho de 1852, quando seus tripulantes, em poucas horas, conseguiram pescar e trazer a terra firme mais de mil desses peixes, não passarão de contos fantásticos, assim como o mito de que o bacalhau fresco nunca existiu, ou então, que é um peixe sem cabeça.

Fontes:

A heróica pesca do bacalhau. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/>>. Acesso em: 17 set. 2009.

Kurlansky, M. Bacalhau: a história do peixe que mudou o mundo. Nova Fronteira: Rio de Janeiro, 2000. 253 p.

O mundo do bacalhau. Disponível em: <<http://www.bacalhau.com.br/>>. Acesso em: 18 set. 2009.

Rosenberg, A.A.; Bolster, W.J.; Alexander, K.E.; Leavenworth, W.B.; Cooper, A.B.; McKenzie, M.G. The history of ocean resources: modeling cod biomass using historical records. Frontiers in Ecology and the Environment, n. 3, v. 2, p. 84-90, 2005.

CAPÍTULO I

RESUMO

O Brasil é dos países líderes na importação de peixes salgados e secos. Em 2008, importou da Noruega cerca de 30 mil toneladas destes produtos, a um custo de aproximadamente 190 milhões de dólares. O bacalhau é um produto salgado e seco bastante apreciado no país, mas espécies afins, de menor valor comercial, são também utilizadas na fabricação de peixes salgados secos e muitas vezes comercializadas como o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*). A variação da razão de isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e de nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) é medida com alta precisão por espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) e nos últimos 20 anos tem aumentado significativamente a aplicação desta tecnologia na avaliação de fraudes e adulterações dos alimentos. O objetivo deste trabalho foi utilizar isótopos estáveis de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ na identificação de bacalhau e espécies afins. Utilizando a análise isotópica, em músculos e ossos, foi possível diferenciar o bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) de Ling, Zarbo e Saithe ($p < 0,01$), que são três produtos salgados e secos de menor valor comercial. Com a pele não foi possível tal distinção entre bacalhau do Pacífico e Ling ($p > 0,05$). A combinação de análises de valores de $\delta^{15}\text{N}$ de diferentes tecidos – músculo, pele e ossos – possibilitou a separação das espécies. A comparação gráfica de valores de $\delta^{15}\text{N}$ de músculo *vs.* pele, músculo *vs.* ossos e pele *vs.* ossos permite estabelecer três regiões de confiança: uma com bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico; outra com Ling e Zarbo; e finalmente, uma terceira região com o Saithe isolada de todos. Os resultados obtidos demonstram que a metodologia é viável para a distinção entre bacalhau e outros peixes salgados secos. No entanto, conclusões mais seguras serão obtidas com uma base de dados, para que, isotopicamente, se faça um histórico da origem desses peixes.

Palavras-chave: *Gadidae*; bacalhau; legalidade; IRMS; $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$.

ABSTRACT

Brazil is the leading country in the importation of salted dried fish. In 2008, Brazil imported from Norway about 30 thousand tones of this products, at a cost of approximately US\$ 190 million. The cod is one of the most popular salted dry product in this country, but related species of lower commercial value, are also used in the manufacture of salted dried fish and often commercialized as the Atlantic cod (*Gadus morhua*). The variation of the stable isotopes ratio of carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) is measured with high precision mass spectrometry isotope ratio (IRMS), and in the last 20 years there was a significant increase of this technology, applied in the evaluation of frauds and food adulterations. The aim of this work was to utilize stable isotope of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in identification of codfish and related species. Utilizing the isotopic analysis in muscles and bones, it was possible to differentiate cod (Atlantic and Pacific) from Ling, Zarbo and Saithe ($p < 0.01$), which are three salted dried products of lower commercial value. Through the skin it was not possible to distinguish between Pacific cod and Ling ($p > 0.05$). The combination of analysis $\delta^{15}\text{N}$ values of different tissues – muscle, skin and bones – enable the separation of species. The graphic comparison of the $\delta^{15}\text{N}$ values of muscle *vs.* skin, muscle *vs.* bones and skin *vs.* bones allow to establish three regions of confidence: one with Atlantic cod and Pacific cod; another with Ling and Zarbo; and finally, one third region with Saithe isolated of all. The results obtained demonstrate that the methodology is feasible to distinguish between cod and other salted dried fish. Nevertheless, a more secure conclusions will be obtained with a database, to do a historic of isotopic origin of these fishes.

Keywords: *Gadidae*; cod; legality; IRMS; $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$.

1 OBJETIVOS

- Verificar a possibilidade de utilizar a metodologia de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) para identificar as diferentes espécies de bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) e de peixes salgados secos, tipo bacalhau salgado seco (Saithe, Ling e Zarbo), normalmente comercializadas no Brasil, e assim detectar eventuais adulterações;
- Analisar a qualidade dos peixes salgados e secos pela análise de parâmetros químicos (umidade, cloretos e cinzas) e físicos (atividade de água – Aa).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os Gadídeos

O bacalhau habita as águas frias do Atlântico Norte, ao longo das regiões costeiras de Newfoundland-Labrador (Canadá), Groenlândia, Islândia e ilhas de Lofoten (Noruega). A sua pesca só ocorre durante um curto período de tempo, entre os meses de dezembro a fevereiro, o que não inviabiliza a disponibilidade da espécie durante o ano inteiro (LUCCIA et al., 2005). Contudo, devido a uma intensa exploração que perdura há séculos (DUTIL e BRANDER, 2003), o esgotamento de praticamente todos os estoques comerciais (FAO, 2009) faz com que viva hoje sob o estigma da erradicação (DUTIL e BRANDER, 2003). Assim, na tentativa de reverter este quadro, o também chamado bacalhau do Atlântico passou a ser utilizado na aquicultura, desde 1980 (OTTERA et al., 2007). Gradualmente, o seu potencial e de outros *Gadídeos* têm sido aproveitados com sucesso em fazendas marinhas de territórios como Noruega, Reino Unido e costa leste dos EUA e Canadá, ou ainda, numa escala menor, Islândia, Espanha e Chile (ROSENLUND e SKRETTING, 2006).

Para os pescadores profissionais, sempre houve cinco tipos de *Gadídeos*: bacalhau do Atlântico, hadoque, pescada-polacha, merlúcio e badejo. Entretanto, um sexto elemento passou a integrar essa lista. É o bacalhau do Pacífico, cuja carne é considerada de categoria ligeiramente inferior à do bacalhau do Atlântico (KURLANSKY, 2000).

A família *Gadidae*, pertencente à ordem *Gadiformes*, é formada por um grupo de aproximadamente 50 espécies, distribuídas em 3 sub-famílias: *Gadinae*, que inclui os peixes de maior valor comercial, como os três do gênero *Gadus* – *Gadus morhua* (bacalhau “cod” ou do Atlântico), *Gadus ogac* (bacalhau da Groenlândia) e *Gadus macrocephalus* (bacalhau do Pacífico) – e outros como o *Pollachius pollachius* (“Pollock”), o *Pollachius virens* (“Saithe”), o *Melanogrammus aeglefinus* (“Haddock”) e o *Merlangius merlangus* (“Whiting”); *Lotinae*, de espécies importantes como *Molva molva* (“Ling”) e *Brosme brosme* (“Zarbo”); e finalmente *Phycinae*, de que fazem parte os

Urophycis spp. (merlúcios) (COHEN et al., 1990). O bacalhau prefere águas rasas e poucas vezes se aventura abaixo de 540 metros de profundidade (KURLANSKY, 2000). A grande maioria dos *Gadídeos* vive em recifes continentais ao longo do Atlântico Norte, mas também habita áreas do Pólo Sul e outros oceanos. Predominantemente, são peixes marinhos bento-pelágicos de águas frias, embora poucas espécies tolerem as baixas salinidades dos estuários e ocasionalmente água doce (COHEN et al., 1990).

2.2 Salga e secagem de peixes

O bacalhau do Atlântico é o maior patrimônio dos povos nórdicos, que ainda se fazem valer de técnicas arcaicas de conservação destes peixes. Capturado com processos simples, mas eficientes, o peixe é secado ao sol, sobre grades de madeira, e depois batido, para se transformar no bacalhau seco e salgado (LUCCIA et al., 2005). A sua carne é a mais branca entre os peixes pertencentes à família *Gadídae*, sendo um dos produtos tradicionais mais apreciados em todo o mundo, sobretudo, devido à estabilidade de armazenamento, sabor e alto valor nutricional (LAURITZSEN et al., 2004).

Atualmente, a Noruega é o maior produtor e exportador de bacalhau salgado e seco. O seu preparo é feito a partir do peixe fresco decapitado, eviscerado e deixado a secar durante cerca de três meses, tanto no inverno quanto na primavera. Finalmente, o produto é armazenado em lugar fresco e seco (LUCCIA et al., 2005). Contudo, a fabricação do bacalhau salgado envolve diferentes processos, de acordo com o tipo de produto final que se deseja (ANDRÉS et al., 2005). Neste caso, normalmente, após a evisceração, os peixes são cortados ao longo da linha mediana ventral e abertos para remoção da espinha, até cerca de 3/4 do seu comprimento. Depois, são amontoados em várias camadas alternadas com finos grãos de sal, sempre de couro voltado para baixo. Após uma semana, é feita outra salga, desta vez com sal grosso. O processo de maturação deste produto requer no mínimo um mês, quando finalmente passam por desidratação num túnel de calor ou através de agentes atmosféricos (LUCCIA et al., 2005).

Salga e secagem são técnicas antigas de conservação de pescado e consistem essencialmente em aumentar a vida de prateleira do produto (FUENTES et al., 2008). Este processo de desidratação e absorção de sal pelos tecidos do peixe ocorre devido à diminuição da atividade de água (MUJAFFAR e SANKAT, 2005), que deve ser baixa o suficiente para impedir o crescimento de bactérias (THORARINSDOTTIR et al., 2001; MUJAFFAR e SANKAT, 2005). A absorção de sal depende de vários fatores, como a espécie, tipo de músculo, tamanho do peixe, espessura do filé, conteúdo e distribuição de lipídios, estado fisiológico, método de salga, relação peixe-sal, temperatura ambiente, congelamento e descongelamento, etc. (WANG et al., 2000). O sal também causa plasmólise, provocando grandes alterações na conformação de proteínas e enzimas (BARAT et al., 2003). Com a desnaturação protéica, os tecidos do peixe perdem a capacidade de retenção de água (THORARINSDOTTIR et al., 2002; MARTÍNEZ-ALVAREZ e GÓMEZ-GUILLÉN, 2006).

Mas o objetivo da salga e secagem do peixe fresco não se restringe apenas a preocupações relacionadas com a sua conservação. Visa também promover alterações sensoriais importantes, que tornam o produto muito apreciado pelos consumidores (ANDRÉS et al., 2005).

Todos os *Gadídeos* podem servir de matéria-prima na arte da salga e secagem de pescado (KURLANSKY, 2000). Mas o bacalhau do Atlântico é o peixe mais indicado para este tipo de atividade, sobretudo pelas suas características sensoriais únicas, aliadas a uma simplicidade muito grande de processos, que conduz a baixos custos de produção (MARTÍNEZ-ALVAREZ e GÓMEZ-GUILLÉN, 2006).

2.3 Comércio de peixes salgados secos no Brasil e no mundo

No mercado brasileiro, existem cinco tipos principais de peixes salgados secos: *Gadus morhua*, também conhecido no Brasil como “Porto”; *Gadus macrocephalus* (“Portinho” ou “Codinho”); Saithe (*Pollachius virens*); Ling (*Molva molva*); e Zarbo (*Brosme brosme*) (BRASIL, 2007). Pelo “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de

Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco”, Bacalhau é o produto salgado ou salgado seco elaborado com peixes das espécies *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus ogac* (BRASIL, 2001). Portanto, os produtos Saithe, Ling e Zarbo são apenas designados peixes salgados ou peixes salgados secos.

Segundo dados apresentados pela Secretaria de Comércio Exterior (SECEX), a Noruega é o principal exportador de peixes salgados e secos (*Gadídeos*) para o Brasil. No ano de 2008, o Brasil importou da Noruega cerca de 30 mil toneladas desses produtos, a um custo de aproximadamente 190 milhões de dólares. A importação desse tipo de produto tem aumentado anualmente, desde 2003, ano que houve uma importação de 17 mil toneladas desses peixes pelo Brasil (BRASIL, 2008). O Saithe é o produto mais importado, tendo praticamente atingido as 20 mil toneladas em 2008, ou seja, aproximadamente 65% do total das importações (CONSELHO NORUEGUÊS DA PESCA, 2008).

2.4 A qualidade de produtos alimentares

A competição na comercialização de alimentos, pressionada por consumidores cada vez mais exigentes, tem contribuído para a necessidade de se colocar no mercado produtos de elevada qualidade (COMI et al., 2005; FÖRSTEL, 2007).

A qualidade de produtos alimentares é determinada por seus atributos sensoriais, composição química, contaminantes toxicológicos e nível microbiológico, vida de prateleira, embalagem e etiquetagem (MOLNÁR, 1995).

Entretanto, se por um lado, a globalização do comércio mundial de pescado trouxe muitos benefícios e oportunidades, também exigiu novos desafios relativamente à qualidade e segurança desses produtos (ABABOUC, 2006). Por isso, novos instrumentos para o controle da qualidade dos alimentos passaram a auxiliar, ou a substituir, os métodos químicos tradicionais, normalmente utilizados na detecção de contaminações. Existe a dificuldade de se fazer um histórico adequado de um alimento, principalmente em relação

à origem geográfica do material e à identidade dos lotes analisados. É também limitada a capacidade em detectar fraudes com elementos sintéticos de características químicas idênticas aos originais. Assim, os isótopos estáveis passam a ser utilizados para analisar os alimentos, as matérias-primas que compõem o produto alimentar e também o ambiente onde estes produtos estão inseridos (FÖRSTEL, 2007).

2.5 Isótopos estáveis

A teoria em torno das técnicas dos isótopos estáveis revela que os principais elementos dos produtos encontrados na natureza existem também espontaneamente na sua forma isotópica. Significa que o mesmo composto químico, proveniente de diferentes fontes, pode ser também constituído por isótopos estáveis em diferentes concentrações naturais (THOMAS et al., 2005). Os seres vivos são formados principalmente por carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e hidrogênio. Por sua vez, estes elementos químicos dispõem de um ou vários isótopos estáveis, cuja característica principal é a não emissão de radiação (TIUNOV, 2007). O mais comum é possuírem um isótopo leve, como ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S e ^1H , mas podem também apresentar um ou mais isótopos pesados, como ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S e ^2H (DUCATTI, 2000).

A análise de isótopos estáveis foi, durante muito tempo, utilizada principalmente por geólogos e geoquímicos, mas nos últimos 20 anos tem aumentado significativamente a aplicação desta tecnologia na avaliação da legalidade dos alimentos (THOMAS et al., 2005).

A relação entre os isótopos estáveis pode ser utilizada como um sinal da matéria e da fonte de energia que caracteriza os organismos, mas também como um integrador na avaliação dos processos ecológicos associados ao fracionamento isotópico (TIUNOV, 2007).

Em geral, a composição isotópica dos constituintes de produtos agrícolas (proteínas, carboidratos, gorduras, minerais) depende de vários fatores. Alguns deles podem indicar a

origem regional, outros estão mais relacionados a fatores de produção. Esses fatores incluem a utilização de fertilizantes, certos alimentos que fazem parte da dieta dos animais, variações sazonais e fatores geográficos (composição do solo, altitude, etc.). Estes afetam a razão de isótopos estáveis e podem ser usados como um sinal da origem regional de produtos agrícolas (LUYKX e VAN RUTH, 2008).

2.6 A espectrometria de massa de razão isotópica – IRMS

A espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry) é uma técnica que permite distinguir compostos quimicamente idênticos, através da análise de seu conteúdo em isótopos (BRENNAN et al., 1997). Para assegurar a eficiência dessa técnica, todas as amostras devem ser convertidas em gases simples, como por exemplo, hidrogênio, dióxido de carbono, monóxido de carbono, nitrogênio, oxigênio ou enxofre (FÖRSTEL, 2007). A razão de isótopos estáveis dos elementos que constituem quase todos os materiais biológicos pode ser determinada por essa técnica, como por exemplo, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$ ou $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ (LUYKX e VAN RUTH, 2008).

2.7 Isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N em estudos ecológicos

Tradicionalmente, isótopos estáveis de carbono e nitrogênio têm sido os elementos químicos mais importantes na análise de alimentos e dietas de animais, enquanto que oxigênio, hidrogênio e enxofre são mais utilizados para rastrear os movimentos dos animais e também estudar as alterações climáticas (HOBSON, 1999; DALERUM e ANGERBJÖRN, 2005).

Em estudos alimentares com animais, uma das condições básicas para a utilização da metodologia dos isótopos estáveis é que as fontes da dieta do animal em questão tenham sinais isotópicos distintos (FORSBERG et al., 1993). As relações entre os isótopos estáveis que ocorrem naturalmente nos tecidos dos animais representam uma combinação dos elementos ingeridos e dos processos de fracionamento (DALERUM e ANGERBJÖRN, 2005). Em geral, os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ presentes nos

animais refletem os valores isotópicos de suas dietas (WADA et al., 1991). Os isótopos de carbono são mais apropriados como marcadores, uma vez que fracionam muito pouco nas cadeias alimentares, ao contrário dos isótopos de nitrogênio que, pelas suas características, são mais utilizados em processos ecológicos (TIUNOV, 2007). Portanto, as análises isotópicas de um animal podem assim ser usadas para reconstruir os seus hábitos alimentares quando as fontes de alimento têm diferentes valores de $\delta^{15}\text{N}$. O $\delta^{15}\text{N}$ do corpo do animal é um parâmetro eficiente para analisar o seu nível trófico num determinado ecossistema, permitindo assim utilizar o ciclo do nitrogênio para idealizar um método analítico capaz de classificar os componentes do reino animal, do ponto de vista biogeoquímico. Por outro lado, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados nos tecidos dos animais são o reflexo de seus hábitos alimentares, baseados em plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 ou C_4 (WADA et al., 1991). Nos ecossistemas aquáticos, as plantas aquáticas e, direta ou indiretamente, as terrestres são as fontes primárias de energia utilizadas pelos animais (FORSBERG et al., 1993).

Os animais podem apresentar, nos seus tecidos celulares, composições isotópicas diferentes das características dos alimentos que consomem, talvez devido a três fatores: 1) “memória” isotópica; 2) fracionamento metabólico, tido como a diferença na composição isotópica entre reagentes e produtos das reações bioquímicas; e 3) direcionamento isotópico. O termo memória isotópica significa que as alterações nas dietas dos animais não provocam mudanças imediatas na composição isotópica de seus tecidos. A dinâmica de incorporação isotópica depende de vários fatores, como o tamanho e a taxa de crescimento do animal, a composição nutricional das dietas, ou o *turnover* catabólico inerente ao tipo de tecido biológico (REICH et al., 2008).

Entretanto, a composição isotópica das fontes de alimentos pode variar continuamente durante o ano, sobretudo em ecossistemas aquáticos. Nesses ambientes, a composição isotópica do plâncton chega a sofrer alterações em torno de 20‰. Sendo o plâncton a base da cadeia alimentar dos organismos aquáticos, tal variabilidade nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ pode alterar significativamente as composições isotópicas dos tecidos dos animais consumidores (PERGA e GERDEAUX, 2005).

Portanto, diferenças sutis na composição isotópica de determinado produto, com a consequente alteração do volume de seus elementos químicos e respectivos isótopos, podem ser medidas através de instrumentos eficazes. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ estão relacionados a hábitos alimentares e em certas circunstâncias podem ser utilizados para verificar a legalidade dos rótulos que acompanham os alimentos industriais (procedência orgânica, tipo de flor que deu origem a determinado mel, peixe oriundo da natureza ou da aquicultura, etc.); a concentração de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ é influenciada pela origem da água no produto – em bebidas pode ser usada para detectar diluições fraudulentas (a diluição em vinhos e sucos de fruta deve trazer rótulos de “produtos não concentrados”); os sinais isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ estão também associados à origem geográfica e podem ser utilizados para verificar a proveniência dos produtos alimentares (THOMAS et al., 2005).

2.8 Alguns estudos desenvolvidos no CIE

O Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciências da Vida (CIE)/UNESP vem desenvolvendo métodos analíticos precisos na detecção de adulterações em alimentos, através da IRMS.

A análise da composição isotópica de ^{13}C em proteína do mel de abelha permite hoje detectar com absoluta certeza possíveis irregularidades quanto ao seu grau de pureza (ARAUCO et al., 2008).

A quantificação do percentual de malte e adjuntos presentes em cervejas tipo *Pilsen*, através de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N , permitiu separar cervejas classificadas como puro malte das que apresentavam arroz em sua composição (SLEIMAN et al., 2008).

Trabalhos de rastreabilidade foram também desenvolvidos com sucesso. Denadai et al. (2008), analisando ovos de galinhas poedeiras comerciais, desenvolveram um método seguro de detecção de farinhas animais em sua alimentação. A alimentação de aves com

farinhas animais é repudiada por muitos países importadores, sobretudo da Comunidade Europeia. Nessa mesma linha de pesquisa, outros trabalhos foram bem sucedidos na detecção de farinhas de origem animal em dietas de frangos (GOTTMANN et al., 2008; MÓRI et al., 2008) e de codornas (MÓRI et al., 2007).

2.9 Estudos com o bacalhau

Normalmente, a aplicação da IRMS em peixes avalia componentes isotópicas de músculos, ossos e escamas, sobretudo para lipídios e derivados, bem como proteínas e aminoácidos. A água corporal pode também ser analisada pelo IRMS (THOMAS et al., 2005). Os dados fornecidos pelo valor de $\delta^{15}\text{N}$ dizem respeito à ingestão e metabolismo das proteínas, enquanto que o valor de $\delta^{13}\text{C}$ presta informações tanto de proteínas quanto de lipídios (PERGA e GERDEAUX, 2005). A utilização de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N tem, por exemplo, permitido distinguir o pescado proveniente da aquicultura e da natureza (MORRISON et al., 2007; SERRANO et al., 2007).

No caso do bacalhau (*Gadus morhua*), Sherwood et al. (2007) compararam os hábitos alimentares de duas populações distintas da espécie, uma que habita as águas próximas de Labrador e outra não muito distante, mais a sul, em Newfoundland, ambas no Canadá. Esses dois grupos de animais apresentaram algumas variações importantes, quanto a crescimento, condição corporal, reserva de gordura ou à idade em que atingem a maturidade sexual. A explicação para tal fenômeno pode estar nas diferenças de alimentação, verificadas através de análise de conteúdo estomacal e de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$). Phillips e Eldridge (2006) já tinham referido que os animais podem ter mudanças nos sinais isotópicos corporais, por alteração de suas dietas, na maior parte das vezes como consequência de migrações para novos ambientes, com características isotópicas diferentes. Portanto, a mesma espécie tende a apresentar características biológicas distintas, influenciadas pelo ambiente onde está inserido.

Quando se pretende estudar espécies provenientes da pesca extrativa, a avaliação dos estoques pesqueiros é fundamental. Joensen et al. (2000) consideram que as áreas de

desova são normalmente distintas, mas devido às migrações, os peixes capturados podem representar vários estoques. Deutch e Berth (2006) conseguiram identificar dois estoques de bacalhau (*Gadus morhua*), localizados em extremos opostos do Mar Báltico, através da razão de isótopos estáveis em tecidos de músculo (^{13}C e ^{15}N) e otólitos (^{13}C e ^{18}O). Entender a estrutura dos estoques de bacalhau e o seu comportamento migratório tem uma importância decisiva na conservação e monitoramento da diversidade dessas populações (BERGSTAD et al., 2008). As explorações intensivas das comunidades de peixes sempre levam a redução drástica das espécies maiores, que normalmente estão no topo das cadeias alimentares, afetando assim a estabilidade geral desses ecossistemas (PINNEGAR et al., 2002).

Os estoques de peixes estão sujeitos a flutuações no tempo e no espaço (CUSHING et al., 1996), não só em função da exploração humana (COOK et al., 1997), mas também de fatores abióticos, como alterações na temperatura, salinidade ou correntes marítimas (CUSHING et al., 1996), e ainda de processos biológicos, como predação, competição e canibalismo (CALEY et al., 1996). Sherwood e Rose (2005) analisaram as composições isotópicas de vários peixes, entre eles o bacalhau, e ainda invertebrados representativos de uma fração da plataforma continental do Canadá, e propuseram montar uma base de dados para auxiliar futuros estudos na área.

A revisão da literatura apresentada serviu como base para o desenvolvimento desta Tese de Doutorado, que está dividida em três artigos científicos:

Artigo científico 1 – REQUISITOS DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA PEIXES SALGADOS E PEIXES SALGADOS E SECOS.

Artigo científico 2 – IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES SALGADOS SECOS DA FAMÍLIA *GADIDAE* ATRAVÉS DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$.

Artigo científico 3 – UTILIZAÇÃO DE $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$ EM TECIDOS DE BAIXA E ALTA ATIVIDADE METABÓLICA NA IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES SALGADOS SECOS.

2.10 Referências

ABABOUC, L. Assuring fish safety and quality in international fish trade. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 561-568, 2006.

ANDRÉS, A.; RODRÍGUEZ-BARONA, S.; BARAT, J.M.; FITO, P. Salted cod manufacturing: influence of salting procedure on process yield and product characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 4, p. 467-471, 2005.

ARAUCO, E.M.R.; FUNARI, S.R.C.; DUCATTI, C.; SILVA, E.T.; VENTURINI FILHO, W.G.; VANDERLINDE, R. Variabilidade isotópica do carbono ($\text{‰}^{13}\text{C}$) em méis brasileiros utilizando sua proteína como padrão interno. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 4, p. 299-304, 2008.

BARAT, J.M.; RODRÍGUEZ-BARONA, S.; ANDRÉS, A.; FITO, P. Cod salting manufacturing analysis. **Food Research International**, v. 36, n. 5, p. 447-453, 2003.

BRASIL. Portaria n. 52, de 29 de dezembro de 2000. Submete a consulta pública o Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe salgado e peixe salgado seco. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 jan. 2001. Seção 1, p. 9. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 8 abr. 2009.

BRASIL. **Comercialização de pescado salgado e pescado salgado seco**: cartilha orientativa. Brasília: ANVISA/ABRAS, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 28 maio 2008.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comércio Exterior (SECEX). **Importação brasileira – Noruega: Principais produtos**. Brasília: SECEX, 2008. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/index.php?area=5>>. Acesso em: 1 dez. 2009.

BERGSTAD, O.A.; JØRGENSEN, T.; KNUTSEN, J.A.; BERGE, J.A. Site of Atlantic cod *Gadus morhua* L. as deduced from telemetry and stable isotope studies. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 131-142, 2008.

BRENNA, J.T.; CORSO, T.N.; TOBIAS, H.J.; CAIMI, R.J. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 16, p. 227-258, 1997.

CALEY, M.J.; CARR, M.H.; HIXON, M.A.; HUGHES, T.P.; JONES, G.P.; MENGE, B.A. Recruitment and the local dynamics of open marine populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, p. 477–500, 1996.

COHEN, D.M.; INADA, T.; IWAMOTO, T.; SCIALABBA, N. **FAO species catalogue**. Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. Rome: FAO Fisheries Synopsis, 1990. v. 10, n. 125, 242 p.

COMI, G.; IACUMIN, L.; RANTSIOU, K.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds. **Food Control**, v. 16, n. 1, p. 37-42, 2005.

CONSELHO NORUEGUÊS DA PESCA (CNP). Exportações do bacalhau da Noruega para o Brasil. Rio de Janeiro: CNP, 2008. Disponível em: <<http://www.bacalhaudanoruega.com.br/>>. Acesso em: 1. dez. 2009.

COOK, R.M.; SINCLAIR, A.; STEFÁNSSON, G. Potential collapse of the North Sea cod stocks. **Nature**, v. 385, p. 521-522, 1997.

CUSHING, J.M.; DENNIS, B.; DESHARNAIS, R.A.; COSTANTINO, R.F. An interdisciplinary approach to understanding nonlinear ecological dynamics. **Ecological Modelling**, v. 92, p. 111-119, 1996.

DALERUM, F.; ANGERBJÖRN, A. Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. **Oecologia**, v. 144, n. 4, p. 647-658, 2005.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; MÓRI, C.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O.; BORDINHON, A.M. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 3, 189-194, 2008.

DEUTSCH, B.; BERTH, U. Differentiation of western and eastern Baltic Sea cod stocks (*Gadus morhua*) by means of stable isotope ratios in muscles and otoliths. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, p. 538–539, 2006.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: CIE, 2000. 138 p. (Apostila).

DUTIL, J.D.; BRANDER, K. Comparing productivity of North Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks and limits to growth production. **Fisheries Oceanography**, v. 12, n. 4-5, p. 502-512, 2003.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**: 2008. Rome: FAO, 2009. 178 p.

FORSBERG, B.R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L.; BONASSI, J.A. Autotrophic carbon sources for fish of the Central Amazon. **Ecology**, v. 74, n. 3, p. 643-652, 1993.

FÖRSTEL, H. The natural fingerprint of stable isotopes—use of IRMS to test food authenticity. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 3, p. 541-544, 2007.

FUENTES, A.; BARAT, J.M.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; SERRA, J.A. Study of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) salting process: Kinetic and thermodynamic control. **Food Control**, v. 19, n. 8, p. 757-763, 2008.

GOTTMANN, R.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.C.; MÓRI, C.; MITUO, M.A.O.; SARTORI, J.R. Rastreabilidade de subprodutos de origem animal em dietas com levedura e trigo para frangos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1641-1647, 2008.

HOBSON, K.A. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. **Oecologia**, v. 120, n. 3, p. 314-326, 1999.

JOENSEN, H.; STEINGRUND, P.; FJALLSTEIN, I.; GRAHL-NIELSEN, O. Discrimination between two reared stocks of cod (*Gadus morhua*) from the Faroe Islands by chemometry of the fatty acid composition in the heart tissue. **Marine Biology**, v. 136, p. 573-580, 2000.

KURLANSKY, M. **Bacalhau**: a história do peixe que mudou o mundo. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2000. 253 p.

LAURITZSEN, K.; AKSE, L.; JOHANSEN, A.; JOENSEN, S.; SØRENSEN, N.K.; OLSEN, R.L. Physical and quality attributes of salted cod (*Gadus morhua* L.) as affected by the state of rigor and freezing prior to salting. **Food Research International**, v. 37, n. 7, p. 677-688, 2004.

LUCCIA, A.D.; ALVITI, G.; LAMACCHIA, C.; FACCIA, M.; GAMBACORTA, G.; LIUZZI, V.; MUSSO, S.S. Effects of the hydration process on water-soluble proteins of preserved cod products. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 385-393, 2005.

LUYKX, D.M.A.M.; VAN RUTH, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products, **Food Chemistry**, v. 107, p. 897-911, 2008.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Effect of brine salting at different pHs on the functional properties of cod muscle proteins after subsequent dry salting. **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 123-129, 2006.

MOLNÁR, P.J. A model for overall description of food quality. **Food Quality and Preference**, v. 6, p. 185-190, 1995.

MÓRI, C.; GARCIA, E.A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.C.; PELÍCIA, K.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O.; BORDINHON, A.M. Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues using carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) stable isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 4, p. 263-269, 2007.

MÓRI, C.; GARCIA, E.A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.C.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O. Poultry offal meal traceability in meat quail tissues using the technique of stable carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 1, p. 45-52, 2008.

MORRISON, D.J.; PRESTON, T.; BRON, J.E.; HEMDERSON, R.J.; COOPER, K.; STRACHAN, F.; BELL, J.G. Authenticating production origin of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by chemical and isotopic fingerprinting. **Lipids**, v. 42, n. 6, p. 537-545, 2007.

MUJAFFAR, S.; SANKAT, C.K. The air drying behaviour of shark fillets. **Canadian Biosystems Engineering**, v. 47, p. 3.11-3.21, 2005.

OTTERA, H.; CARLEHÖG, M.; KARLSEN, Ø.; AKSE, L.; BORTHEN, J.; EILERTSEN, G. Effect of diet and season on quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 1623-1629, 2007.

PERGA, M.E.; GERDEAUX, D. “Are fish what they eat” all year round? **Oecologia**, v. 144, n. 4, p. 598-606, 2005.

PHILLIPS, D.L.; ELDRIDGE, P.M. Estimating the timing of diet shifts using stable isotopes. **Oecologia**, v. 147, n. 2, p. 195-203, 2006.

PINNEGAR, J.K.; JENNINGS, S.; O'BRIEN, C.M.; POLUNIN, N.V.C. Long-term changes in the trophic level of the Celtic Sea fish community and fish market price distribution. **Journal of Applied Ecology**, v. 39, p. 377–390, 2002.

REICH, K.J.; BJORNDAL, K.A.; MARTÍNEZ DEL RIO, C. Effects of growth and tissue type on the kinetics of ^{13}C and ^{15}N incorporation in a rapidly growing ectotherm. **Oecologia**, v. 155, n. 4, p. 651-663, 2008.

ROSENLUND, G.; SKRETTING, M. Worldwide status and perspective on gadoid culture. **ICES Journal of Marine Science**, v. 63, p. 194-197, 2006.

SERRANO, R.; BLANES, M.A.; ORERO, L. Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean. **Chemosphere**, v. 69, n. 7, p. 1075-1080, 2007.

SHERWOOD, G.D.; ROSE, G.A. Stable isotope analysis of some representative fish and invertebrates of the Newfoundland and Labrador continental shelf food web. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 63, p. 537–549, 2005.

SHERWOOD, G.D.; RIDEOUT, R.M.; FUDGE, S.B.; ROSE, G.A. Influence of diet on growth, condition and reproductive capacity in Newfoundland and Labrador cod (*Gadus*

morhua): Insights from stable carbon isotopes ($\delta^{13}\text{C}$). **Deep-Sea Research II**, v. 54, p. 2794-2809, 2007.

SLEIMAN, M.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C.; NOJIMOTO, T. Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 95-102, 2008.

THOMAS, F.; JAMIN, E.; LEES, M. Isotopic analysis of lipids as a mean of authenticating fish products. **Lipid Technology**, v. 17, n. 9, p. 204-208, 2005.

THORARINSDOTTIR, K.A.; ARASON, S.; BOGASON, S.G.; KRISTBERGSSON, K. Effects of phosphate on yield, quality, and water-holding capacity in the processing of salted cod (*Gadus morhua*). **Journal of Food Science**, v. 66, n. 6, p. 821-826, 2001.

THORARINSDOTTIR, K.A.; ARASON, S.; GEIRSDOTTIR, M.; BOGASON, S.G.; KRISTBERGSSON, K. Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 377-385, 2002.

TIUNOV, A.V. Stable isotopes of carbon and nitrogen in soil ecological studies. **Biology Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 395-407, 2007.

WADA, E.; MIZUTANI, H.; MINAGAWA, M. The use of stable isotopes for food web analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 361-371, 1991.

WANG, D.; TANG, J.; CORREIA, L.R. Salt diffusivities and salt diffusion in farmed Atlantic salmon muscle as influenced by rigor mortis. **Journal of Food Engineering**, v. 43, n. 2, p. 115-123, 2000.

CAPÍTULO II

REQUISITOS DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA PEIXES SALGADOS E PEIXES SALGADOS E SECOS

RESUMO

No comércio mundial de peixes salgados e secos, o Brasil é um dos principais importadores. Entretanto, a comercialização desse tipo de produto deve atender a determinadas características de qualidade estabelecidas pela legislação brasileira, baseadas principalmente nos níveis de sal e umidade. O objetivo deste estudo foi analisar indicadores físicos e químicos de bacalhau do Atlântico, bacalhau do Pacífico, Ling, Zarbo e Saithe. Foram realizadas análises de umidade, cloretos, cinzas e atividade de água. Os teores médios de sal variaram entre 19,9 a 25,8%, enquanto os teores de umidade variaram de 49,4 a 52,3%. Os resultados mostraram que a legislação brasileira deve ser revista, para que os limites legais de sal e umidade estejam de acordo com a categoria do produto – bacalhau salgado verde e peixes salgados verdes; bacalhau salgado semi-seco e peixes salgados semi-secos; bacalhau salgado seco e peixes salgados secos. Os métodos de análise não correspondem aos descritos por órgãos internacionais. Sugere-se a inclusão da atividade de água como parâmetro de apoio na avaliação da vida de prateleira desses produtos.

Palavras-chave: *Gadidae*; bacalhau; qualidade; umidade; cloretos; atividade de água.

ABSTRACT

In the international dry salted fish trade, Brazil is one of the major importers. Nevertheless, the commercialization of these products must be in accordance with some requirements of quality fixed by Brazilian legislation, based mainly in moisture and sodium chloride levels. The aim of this study was to analyze physical and chemical indicators of Atlantic cod, Pacific cod, Ling,

Zarbo and Saithe. There are analyzed moisture content, sodium chloride, ash and water activity. The average rate of salt varied between 19.9 to 25.8%, while the values of moisture varied between 49.4 to 52.3%. The results showed that the Brazilian legislation should be revised so that the legal limits of salt and moisture are consistent with the product category – salted green cod and salted green fish; salted cod partially dried and salted fish partially dried; salted dried cod and salted dried fish. The methods of analysis do not correspond to those described by international organism. The inclusion of water activity as parameter of quality in shelf-life estimation of these products was suggested.

Keywords: *Gadidae*; cod; quality; moisture; sodium chloride; water activity.

INTRODUÇÃO

O Brasil é dos países que mais tem movimentado o comércio mundial de peixes salgados e secos, sendo um dos principais mercados consumidores. Em 2007, o Brasil importou 35.393 toneladas de bacalhau, a um custo de 226 milhões de dólares (USDA FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, 2008).

Salga e secagem são técnicas antigas de conservação de pescado e consistem essencialmente em prolongar a vida de prateleira do alimento (FUENTES et al., 2008). Envolvem diferentes processos, que variam de acordo com o tipo de produto final desejado pelas indústrias (ANDRÉS et al., 2005). São processos longos e sujeitos a grande manipulação (RODRIGUES et al., 2003), com influência nos atributos de qualidade do produto final. Estes atributos podem ser: nutricionais, microbiológicos, bioquímicos e físico-químicos (BARAT et al., 2006). No caso de peixes salgados ou salgados secos, a sua qualidade está intrinsecamente vinculada à da matéria-prima, ao método de salga, ao controle da temperatura e umidade durante o transporte, entre outros requisitos do processamento (BRASIL, 2007).

No Brasil, as normas para comercialização de peixes salgados e secos são baseadas no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco (BRASIL, 2001). Teores de sal (NaCl) e umidade são os requisitos químicos considerados. Para peixes salgados secos, é fixado um limite mínimo de 10% de sal e um máximo de 45% de umidade (peixes considerados magros).

O objetivo deste trabalho foi analisar indicadores físicos e químicos dos principais peixes salgados comercializados no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados: Bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua*; Bacalhau do Pacífico, *Gadus macrocephalus*; Ling, *Molva molva*; Zarbo, *Brosme brosme*; e Saithe, *Pollachius virens*.

As amostras de carne, com aproximadamente 100g, foram obtidas em supermercados e empresas importadoras do Estado de São Paulo. As análises foram realizadas na Universidade Estadual Paulista (UNESP) / Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, Campus de Botucatu-SP, Brasil.

O teor de umidade foi determinado após secagem das amostras em estufa, a 105° C, por 16-18 horas; as cinzas, ou resíduo mineral fixo, foram determinadas após incineração das amostras em mufla, a 550° C; e o teor de cloretos determinado a partir da titulação de alíquotas da solução em análise com uma solução padrão de nitrato de prata, conforme método de Mohr ou argentométrico, segundo recomendações da Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999 (BRASIL, 1999).

A atividade de água foi medida por método direto, através do analisador *Aqualab 3T*, da Decagon Devices.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A comparação das médias foi realizada através de análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados das análises físicas e químicas dos peixes são mostrados na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$). Os teores médios de umidade variaram entre 49,4 a 52,3% e os teores médios de sal (NaCl) entre 19,9 a 25,8%. Como se esperava, os teores de cinzas estão em conformidade com os de sal, ou seja, peixes mais salgados têm valores mais elevados de cinzas. Os valores de atividade de água são característicos de alimentos com umidade intermediária.

A Figura 1 confronta os resultados das análises de umidade e cloretos com a Legislação Brasileira. Todas as amostras de peixe salgado seco têm mais de 10% de sal (Fig. 1-A), portanto, estão de acordo com os padrões definidos pela legislação. Porém, em relação à umidade, apenas uma amostra de bacalhau do Atlântico, uma de bacalhau do Pacífico, uma de Saithe e uma de Zarbo estão dentro dos limites legais, de no máximo 45% (Fig. 1-B).

Tabela 1 – Análises físicas e químicas de amostras de cinco tipos de peixe salgado seco comercializados no Brasil (média \pm dp).

Peixes salgados secos	Aa	Ud (%)	Cz (%)	Cl (%)
Bacalhau do Atlântico	0,750 \pm 0,008	52,3 \pm 4,4	21,9 \pm 2,6	21,3 \pm 2,3
Bacalhau do Pacífico	0,745 \pm 0,003	49,6 \pm 7,8	27,4 \pm 8,4	25,8 \pm 7,4
Ling	0,747 \pm 0,003	51,4 \pm 1,4	20,2 \pm 1,4	19,9 \pm 1,1
Zarbo	0,746 \pm 0,003	49,4 \pm 4,9	23,6 \pm 3,2	22,5 \pm 3,8
Saithe	0,742 \pm 0,002	50,8 \pm 5,1	21,1 \pm 2,3	20,3 \pm 1,9

Aa: Atividade de água; Ud: Umidade; Cz: Cinzas; Cl: Cloretos (NaCl).

Aa e Ud - Bacalhau do Atlântico: n = 8; Bacalhau do Pacífico: n = 4; Ling: n = 5; Zarbo: n = 6; Saithe: n = 7.

Cz e Cl - Bacalhau do Atlântico: n = 7; Bacalhau do Pacífico: n = 3; Ling: n = 3; Zarbo: n = 5; Saithe: n = 6.

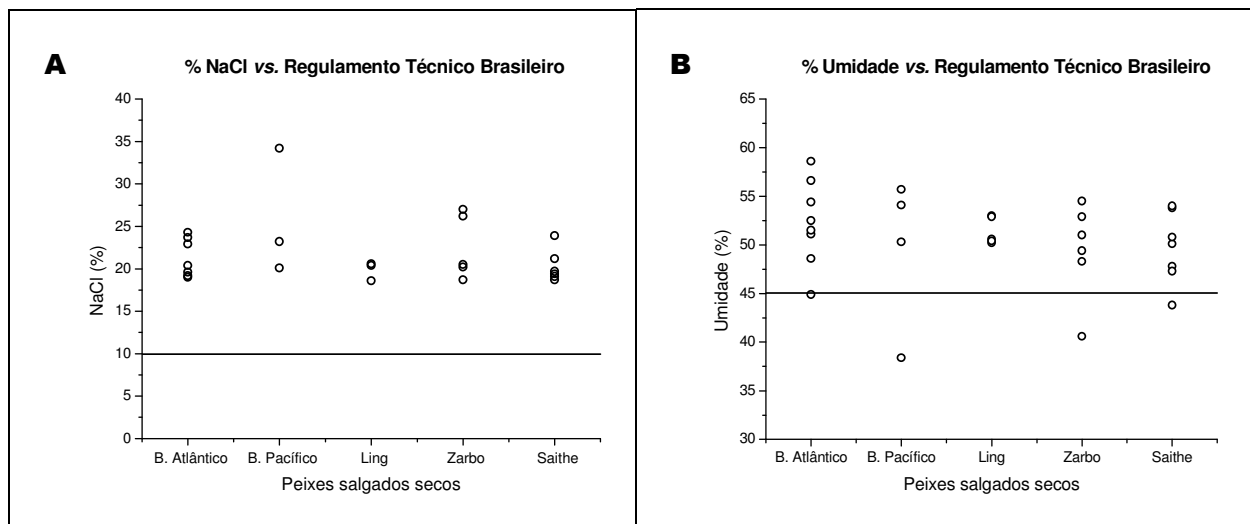


Figura 1 – Teores de NaCl (A) e umidade (B) versus legislação brasileira, que estabelece um limite mínimo de 10% de sal e máximo de 45% de umidade.

A) Bacalhau do Atlântico: n = 7; Bacalhau do Pacífico: n = 3; Ling: n = 3; Zarbo: n = 5; Saithe: n = 6.

B) Bacalhau do Atlântico: n = 8; Bacalhau do Pacífico: n = 4; Ling: n = 5; Zarbo: n = 6; Saithe: n = 7.

Os resultados demonstram que 50% das amostras analisadas apresentaram teores de sal na faixa de 20-25%; 37,5% apresentaram teores situados entre 18-20%; e as demais amostras (12,5%) teores de sal superiores a 25% (Fig. 1-A).

DISCUSSÃO

O objetivo da salga é diminuir a atividade de água (Aa) do produto a níveis que permitam aumentar a sua estabilidade microbiana, química e bioquímica (CHIRALT et al., 2001). Aa é o parâmetro mais importante para prevenção ou limitação do crescimento microbiológico, sendo responsável pela estabilidade do alimento, modulação da resposta microbiológica e determinante do tipo de microrganismos encontrados no alimento (CHIRIFE et al., 2006). Neste estudo, os valores de Aa foram muito semelhantes, em torno de 0,74-0,75 (Tab. 1). Esses produtos estão dentro da categoria de alimentos estáveis que, segundo Jay (2005), contêm entre 15 a 50% de umidade e Aa entre 0,60 a 0,85. A Aa não é considerada na legislação brasileira como parâmetro de qualidade de peixes salgados secos.

Os valores encontrados para os teores de umidade demonstram que a Legislação brasileira não é considerada na importação de bacalhau e dos demais peixes salgados e secos. Na verdade, a entrada da Noruega na produção de peixes salgados levou à alteração dos métodos de salga, diferindo dos tradicionais métodos de salga e secagem desenvolvidos pelos portugueses. Para se adequar aos novos tempos, Portugal, que hoje é um grande importador de bacalhau salgado da Noruega, elaborou novas regras para comercialização do bacalhau, onde foram definidos os parâmetros legais para conteúdo de sal e teores de umidade nas seguintes categorias: bacalhau verde e espécies afins verdes (teor de sal igual ou superior a 16% e teor de umidade superior a 51% e inferior a 58%); bacalhau salgado semi-seco e espécies afins semi-secas (teor de sal igual ou superior a 16% e teor de umidade superior a 47% e inferior a 51%); e bacalhau salgado seco e espécies afins salgadas secas (teor de sal igual ou superior a 16% e teor de umidade inferior a 47%) (PORTUGAL, 2005b).

A Figura 1 mostra que os teores de cloretos iguais ou superiores a 16% e teores de umidade situados entre 51% e 58%, como especifica a Legislação portuguesa para bacalhau ou espécies afins verdes, são encontrados em cinco amostras de bacalhau do Atlântico, três amostras de bacalhau do Pacífico, três amostras de Ling, três amostras de Zarbo e duas de Saithe. Estes

resultados demonstram a necessidade de atualizar a Legislação brasileira para que as importações atendam aos requisitos legais.

Recentemente, foram apresentados no World Seafood Congress, por Gandini et al. (2009), dados que demonstram a adulteração do peso de pescado pela injeção de líquidos, e este fato também deve ser avaliado para garantir que não haja ações de adulteração do bacalhau salgado e seco por este método.

Uma questão importante em relação aos teores de sal e umidade de peixes salgados é que a Legislação brasileira estabelece a utilização de secagem em estufa da amostra de peixe salgado para determinação dos teores de umidade. Porém, tanto a Association of Official Analytical Chemists quanto a Norma Portuguesa estabelecem que, em análises de umidade, a amostra deve ser previamente dispersa em areia lavada ou lã de vidro e posteriormente secada em estufa (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2005; PORTUGAL, 2005a).

Em relação à determinação de cloretos, o método preconizado pela Association of Official Analytical Chemists e pela Norma Portuguesa é o método de Volhard ou método mercurométrico (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2005; PORTUGAL, 2005a).

Os teores de cinzas variaram na proporção dos níveis de sal das amostras. As cinzas são, na verdade, uma maneira indireta de avaliar a absorção do sal, porque o cloreto não se decompõe em temperaturas até 550° C (SANT'ANA, 2003).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que o regulamento técnico para peixes salgados no Brasil é bastante falho, havendo a necessidade de uma revisão dos limites legais para os teores de sal e de umidade e, a exemplo da Norma Portuguesa, incluir os novos processos para obtenção dos produtos salgados. O mais importante seria incluir a Aa nos parâmetros, facilitando assim um melhor entendimento dos processos de deterioração que irão ocorrer durante a vida de prateleira do produto.

Por outro lado, as metodologias determinadas pela Legislação devem ser revistas para se adequar às indicações de métodos oficiais de análise de órgãos internacionais.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Arlington: Association of Analytical Chemists, 2005.

ANDRÉS, A.; RODRÍGUEZ-BARONA, S.; BARAT, J.M.; FITO, P. Salted cod manufacturing: influence of salting procedure on process yield and product characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 4, p. 467-471, 2005.

BARAT, J.M.; GALLART-JORNET, L.; ANDRÉS, A.; AKSE, L.; CARLEHOG, M.; SKJERDAL, O.T. Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 9-19, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Anexo – **Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 11 set. 2009.

BRASIL. Portaria n. 52, de 29 de dezembro de 2000. Submete a consulta pública o Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe salgado e peixe salgado seco. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 jan. 2001. Seção 1, p. 9. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 8 abr. 2009.

BRASIL. **Comercialização de pescado salgado e pescado salgado seco**: cartilha orientativa. Brasília: ANVISA/ABRAS, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 28 maio 2008.

CHIRALT, A.; FITO, P.; BARAT, J.M.; ANDRÉS, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; ESCRICHE, I.; CAMACHO, M.M. Use of vacuum impregnation in food salting process. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 141-151, 2001.

CHIRIFE, J.; ZAMORA, M.C.; MOTTO, A. The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. **Journal of Food Engineering**, v. 72, p. 287-292, 2006.

FUENTES, A.; BARAT, J.M.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; SERRA, J.A. Study of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) salting process: Kinetic and thermodynamic control. **Food Control**, v. 19, n. 8, p. 757-763, 2008.

GANDINI, G.; BERNARDI, C.; CATTANEO, P.; MENOTTA, S.; FEDRIZZI, G.; VILLA, G.; TEPEDINO, J.B.V. *L'évolution des fraudes de produits de la pêche commercialisés. Mise à jour pour l'inspection*. IAFI World Seafood Congress, Morocco, 2009. Disponível em: <<http://www.iafi.net/resources/>>. Acesso em: 2 dez. 2009.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

PORTUGAL. Ministério da Agricultura, Pescas e Florestas. Decreto-Lei n. 25/2005, de 28 de janeiro de 2005. Define novas normas de comercialização para o bacalhau e espécies afins, salgados, verdes e secos. **Diário da República**, Lisboa, 28 jan. 2005a. I Série A, n. 20, p. 696. Disponível em: <http://www.igp.pt/consulta_docs.php?Id=240>. Acesso em: 12 mar. 2009.

PORTUGAL. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. **Comércio de Bacalhau com novas regras**, 2005b. Disponível em: <<http://www.portugal.gov.pt/Portal/Print.aspx?guid=%7B04E2A4B3-3E5A-4CC3-969A-9429750DA91E%7D>>. Acesso em: 1 maio 2009.

RODRIGUES, M.J.; HO, P.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; VAZ-PIRES, P.; NUNES, M.L. Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 471-481, 2003.

SANT'ANA, L.S. Influência do alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.) na atividade da água e oxidação lipídica de peixes de uma espécie de tilápia (*Oreochromis ssp.* – var. vermelha Flórida) submetidos à salga. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 51-55, 2003.

USDA FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Brazil Fishery Products Annual Report**. 2008. Disponível em: <<http://www.thefishsite.com/.../brazil-fishery-products-annual-report-2008>>. Acesso em: 11 set. 2009.

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES SALGADOS SECOS DA FAMÍLIA *GADIDAE* ATRAVÉS DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$

RESUMO

O bacalhau salgado é um dos produtos da pesca mais valorizados em todo o mundo e o Brasil um dos principais mercados consumidores. A legislação brasileira considera que bacalhau são produtos processados utilizando peixes do gênero *Gadus*. Entretanto, outras espécies da mesma família são comercializadas como bacalhau. Uma técnica capaz de detectar fraudes em alimentos é a espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS). O objetivo deste trabalho foi verificar se peixes salgados secos da família *Gadidae* podem ser identificados por esse processo. Assim, foram analisados os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de músculos de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), bem como de outros peixes salgados secos: Ling (*Molva molva*), Zarbo (*Brosme brosme*) e Saithe (*Pollachius virens*). Os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ mostraram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os dois tipos de bacalhau e os produtos Ling, Zarbo e Saithe. Portanto, bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico são estatisticamente idênticos, mas podem ser diferenciados de Ling, Zarbo e Saithe pela análise dos valores de $\delta^{15}\text{N}$. Os resultados deste estudo fornecem informações para elaboração de uma base de dados.

Palavras-chave: Bacalhau; músculo; IRMS; fracionamento isotópico; $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$.

ABSTRACT

Salted cod is one of most valuable fishery products in the world, and Brazil is one of major consumer markets. By Brazilian legislation, cod is a product processed only with fishes of genus *Gadus*. However, another *Gadidae* species were commercialized as cod. Isotope ratio mass

spectrometry (IRMS) is a technique able to detect frauds in foods. The aim of this work was to examine if salted dried fishes of *Gadidae* family may be identified by this process. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were analyzed in muscles of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Pacific cod (*Gadus macrocephalus*), and other salted dried fishes: Ling (*Molva molva*), Zarbo (*Brosme brosme*) and Saithe (*Pollachius virens*). The average values of $\delta^{15}\text{N}$ showed significant differences ($p < 0.01$) between cod and Ling, Zarbo and Saithe products. Thus, Atlantic cod and Pacific cod are statistically identical, but can be differentiated from Ling, Zarbo and Saithe by analysis of $\delta^{15}\text{N}$ values. The results of this study supply information to elaboration a database.

Keywords: Cod; muscle; IRMS; isotopic fractionation; $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$.

INTRODUÇÃO

Bacalhau salgado é um produto muito apreciado, tanto pelo sabor, aroma e textura, quanto pela alta estabilidade e valor nutricional, mas a sobre-exploração das espécies *Gadus* tem levado ao estabelecimento de cotas de pesca, causando expressivo aumento no preço do produto salgado (LAURITZSEN, 2004).

O Brasil é dos países que mais tem movimentado o comércio mundial de peixes salgados secos, sendo um dos principais mercados consumidores. Em 2007, o Brasil importou 35.393 toneladas de bacalhau, a um custo de 226 milhões de dólares (USDA FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, 2008).

Em função da produção global de peixes, espécies similares podem ser comercializadas de forma indevida em ações fraudulentas (BELL et al., 2007).

A legislação brasileira criou um regulamento de identidade e qualidade desses produtos, que discrimina bacalhau de outros peixes salgados secos. Essa legislação estabelece que o bacalhau só pode ser produzido com as espécies *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus ogac*, enquanto que as demais espécies, tais como *Molva molva* (Ling), *Brosme brosme* (Zarbo) e *Pollachius virens* (Saithe) devem ser comercializadas como peixe salgado e seco (BRASIL, 2001). Entretanto, usualmente estas espécies são comercializadas como bacalhau.

A Norma Portuguesa utiliza a mesma denominação da Legislação Brasileira para bacalhau, enquanto que as demais espécies salgadas são chamadas de espécies afins (PORTUGAL, 2005).

Espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) é uma técnica que oferece uma inequívoca evidência da adulteração de alimentos e tem sido usada para detectar fraudes (KELLY, 2003).

A análise de isótopos estáveis tem sido utilizada para várias finalidades na indústria de alimentos, como por exemplo: distinção entre peixes de aquicultura e da natureza (MORENO ROJAS et al., 2007; SERRANO et al., 2007; DEMPSON e POWER, 2004); adulteração em bebidas (ROSSMANN, 2001); determinação de origem geográfica de alimentos (LUYKX e VAN RUTH, 2008).

O objetivo deste trabalho foi verificar se músculos de cinco espécies de peixes salgados secos da família *Gadidae* podem ser identificados pela análise de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N .

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Os peixes salgados secos avaliados neste estudo podem ser divididos em duas categorias comerciais, de acordo com o regulamento técnico estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001): (1) Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e Bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*); (2) peixes salgados secos da família *Gadidae*: Ling (*Molva molva*), Zarbo (*Brosme brosme*) e Saithe (*Pollachius virens*).

Amostras dessas cinco espécies foram adquiridas em supermercados e empresas importadoras do Estado de São Paulo, Brasil.

Análises de isótopos estáveis

A análise de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N foi medida em espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS), na Universidade Estadual Paulista (UNESP) / Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciência da Vida (CIE), Campus de Botucatu-SP, Brasil.

Pequenos pedaços de músculo foram secos em estufa, a 50° C, durante 48 horas, e moídos em moinho criogênico, para homogeneização. As partículas finíssimas resultantes foram então pesadas (50-60µg e 500-600µg para análise de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente) e colocadas em cápsulas de estanho. Finalmente, essas cápsulas foram submetidas a combustão total sob fluxo contínuo de Hélio, a 1020° C, através do analisador elementar (EA 1108 – CHN Fisons

Elemental Analyzer), acoplado ao espectrômetro de massa *Delta S Finnigan Mat*, com erro analítico de 0,2‰ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e 0,3‰ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

As razões isotópicas das amostras, analisadas em duplicata, foram comparadas com os padrões internacionais estabelecidos para o carbono – PDB (*Pee Dee Belemnite*, um fóssil de *Belemnitella americana* da formação Peedee, da Carolina do Sul, EUA) – e para o nitrogênio – ar atmosférico (N_2). Esses valores, designados pela terminologia *delta* (δ), em per mil (‰), foram calculados através da seguinte equação:

$$\delta X (\text{‰}) = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}) / R_{\text{padrão}}] \times 1000,$$

em que X representa ^{13}C ou ^{15}N e R corresponde à razão isotópica de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

Análises estatísticas

A comparação das médias foi realizada através de análise de variância (One-way ANOVA) e posteriormente foi adotado o teste de Tukey, com significâncias estatísticas de 5%.

RESULTADOS

Os valores médios dos sinais isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, com os respectivos valores mínimos e máximos, de amostras de músculo das cinco espécies de peixe salgado seco podem ser visualizados na Tabela 1. A comparação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ não mostrou diferença significativa entre as espécies ($p > 0,05$). Em relação aos valores de $\delta^{15}\text{N}$, tanto o bacalhau do Atlântico quanto o bacalhau do Pacífico diferiram significativamente de Ling, Zarbo e Saithe ($p < 0,01$). Entretanto, os dois tipos de bacalhau são estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Na comparação dos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ de Ling, Zarbo e Saithe, também não houve diferenças significativas ($p > 0,05$).

Em relação aos valores médios de $\delta^{13}\text{C}$, os dois tipos de bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) tendem a apresentar um enriquecimento na sua composição isotópica, quando comparados com as demais espécies. O mesmo se verifica na comparação dos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$, em que bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico são mais ricos que Saithe, Ling e Zarbo.

Analisando ainda a Tabela 1, pode-se verificar que os valores máximos de $\delta^{15}\text{N}$ de Zarbo (17,42‰), Ling (17,04‰), e Saithe (15,70‰) estão distantes dos valores mínimos de $\delta^{15}\text{N}$ de bacalhau do Atlântico (17,55‰). Os valores mínimos de $\delta^{15}\text{N}$ de bacalhau do Pacífico (17,14‰) se distanciam também dos valores máximos de $\delta^{15}\text{N}$ de Ling e Saithe, mas se sobrepõem aos valores máximos de $\delta^{15}\text{N}$ de Zarbo. Não foi possível fazer esse tipo de comparação entre os dois tipos de bacalhau, porque os valores máximos e mínimos de $\delta^{15}\text{N}$ se sobrepõem. Tal sobreposição ocorre igualmente para valores máximos e mínimos de $\delta^{13}\text{C}$, em amostras de músculo das cinco espécies, o que também inviabiliza essa comparação.

Tabela 1 – Valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em músculos de cinco espécies de peixe salgado seco (média \pm desvio padrão).

Peixes salgados secos	n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			
		média	dp	mín.	máx.	média	dp	mín.	máx.
Bacalhau do Atlântico (<i>Gadus morhua</i>)	7	-19,43 ^a	0,6	-20,43	-18,64	18,46 ^a	0,8	17,55	19,48
Bacalhau do Pacífico (<i>Gadus macrocephalus</i>)	4	-18,95 ^a	0,5	-19,69	-18,67	18,33 ^a	0,9	17,14	19,32
Ling (<i>Molva molva</i>)	5	-19,62 ^a	0,7	-20,23	-18,76	15,76 ^b	1,1	14,29	17,04
Zarbo (<i>Brosme brosme</i>)	5	-19,15 ^a	0,9	-20,55	-18,24	15,79 ^b	1,2	14,13	17,42
Saithe (<i>Pollachius virens</i>)	7	-20,18 ^a	0,8	-21,27	-19,13	14,74 ^b	1,0	12,97	15,70

Nas colunas, médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,01$).

A comparação entre os valores máximo e mínimo de $\delta^{15}\text{N}$ das cinco espécies permitem distanciar bacalhau do Atlântico de Saithe, Ling e Zarbo, em 1,85‰, 0,51‰ e 0,13‰, respectivamente. O bacalhau do Pacífico se distancia apenas de Saithe e Ling, em 1,44‰ e 0,10‰, respectivamente. Como se nota na Figura 1, estes resultados permitem identificar duas regiões de confiança, de acordo com a categoria comercial das espécies: uma que separa bacalhau do Atlântico de peixes sem designação de bacalhau (Ling, Zarbo e Saithe) (Fig. 1-A); outra que apenas separa bacalhau do Pacífico de Ling e Saithe (Fig. 1-B).

O Zarbo foi excluído das duas regiões identificadas na Figura 1-B, porque seu valor máximo de $\delta^{15}\text{N}$ se sobrepõe ao valor mínimo de $\delta^{15}\text{N}$ de bacalhau do Pacífico, embora seus valores médios tenham permitido diferenciá-los estatisticamente ($p < 0,01$) (Tab. 1).

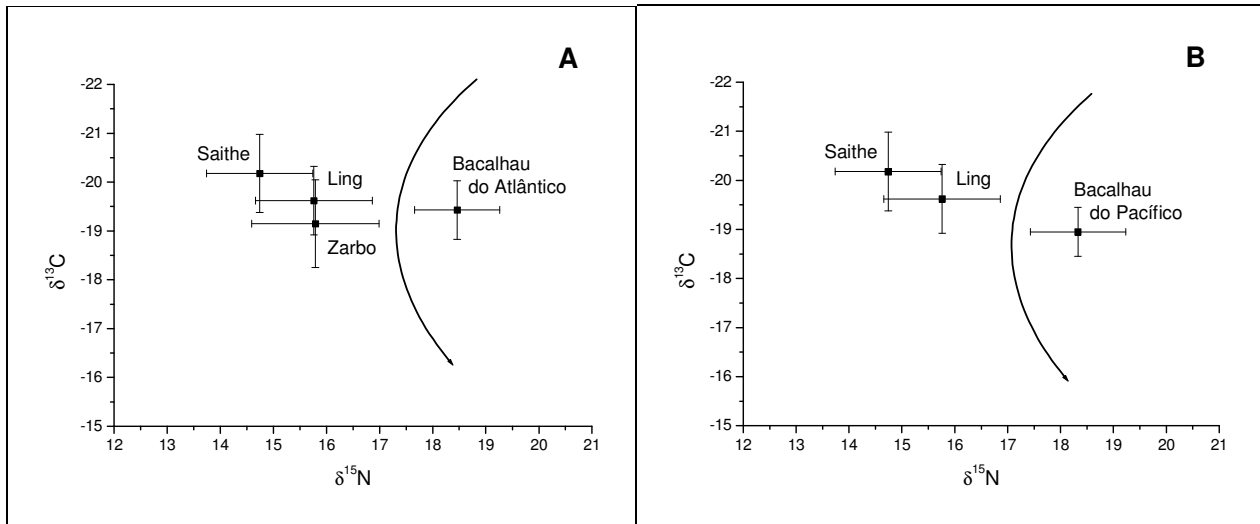


Figura 1 – Valores médios (\pm dp) de $\delta^{15}\text{N}$ vs. $\delta^{13}\text{C}$ em músculos de peixes salgados secos.

DISCUSSÃO

Neste estudo, as análises estatísticas dos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de músculo permitiram diferenciar os dois tipos de bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) de peixes de menor valor comercial, como Ling, Zarbo e Saithe. Os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras não se mostraram tão importantes. Mas o confronto entre os valores máximo e mínimo de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ tornaram visíveis duas regiões de confiança separando essas duas categorias comerciais, embora a distinção entre bacalhau do Pacífico e Zarbo pareça mais difícil de ser alcançada, por sobreposição de dados.

Essas regiões de confiança identificadas na Figura 1 estão, por sua vez, sujeitas a flutuação. Sendo tais dados o reflexo da variabilidade natural que caracteriza os estoques pesqueiros (CUSHING et al., 1996), um número maior de amostras traria resultados mais conclusivos. Isso permitiria a criação de uma base de dados, como referido por Sherwood e Rose (2005), visando mapear as diferenças que ocorrem de um meio para outro.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ nos animais são o reflexo dos valores isotópicos de suas dietas e esta variabilidade depende do alimento que essas espécies têm à disposição nos diferentes ecossistemas onde forem capturados (WADA et al., 1991).

O bacalhau do Atlântico, considerado aqui como referência, é o peixe dominante em muitos ecossistemas (LINK e GARRISON, 2002), um predador que normalmente se situa no topo das cadeias alimentares onde vive. São características aplicáveis também às restantes espécies analisadas neste estudo (COHEN et al., 1990). A dificuldade em rastreá-los, através dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, está na sua mobilidade. Capturas de bacalhau em determinado estoque pesqueiro podem incluir exemplares de outras procedências (JOENSEN et al., 2000) e, conseqüentemente, com hábitos alimentares diferentes.

Isso talvez explique as variações nos sinais isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$, obtidas no bacalhau do Atlântico (1,93‰) e também no bacalhau do Pacífico (2,18‰), Ling (2,75‰), Zarbo (3,29‰) e Saithe (2,73‰). Portanto, esse fracionamento isotópico pode indicar que os peixes são de diferentes procedências e níveis tróficos distintos. De acordo com DeNiro e Epstein (1981), valores de $\delta^{15}\text{N}$ de 2-5‰ caracterizam níveis tróficos diferentes. Deutsch e Berth (2006), ao detectarem um fracionamento isotópico (3,1‰) nos valores de $\delta^{15}\text{N}$, em dois estoques de bacalhau localizados em lados opostos do Mar Báltico, explicaram do mesmo modo o fracionamento.

As variações nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram de 1,79‰ (bacalhau do Atlântico), 1,02‰ (bacalhau do Pacífico), 1,47‰ (Ling), 2,31‰ (Zarbo) e 2,14‰ (Saithe), indicando também hábitos alimentares diferentes entre as espécies. Wada et al. (1991) referem que, para valores de $\delta^{13}\text{C}$, variações em torno de 1‰ refletem níveis tróficos diferentes.

Pinnegar et al. (2002) fizeram um levantamento da comunidade de peixes do Mar Céltico, que incluía bacalhau do Atlântico, Ling e Saithe, com seus valores de $\delta^{15}\text{N}$ fixados em 15,2‰, 15,3‰ e 14,4‰, respectivamente. Os valores médios do bacalhau do Atlântico obtidos neste estudo (Tab. 1) mostram um enriquecimento de N em 3,26‰. Essa diferença ocorre pela variabilidade natural que caracteriza os diferentes ambientes de captura. No caso do Ling e do Saithe, esses valores são idênticos aos verificados neste estudo (Tab. 1).

CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que é possível identificar e separar os dois tipos de bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) dos demais peixes salgados secos (Ling, Zarbo e Saithe) pela análise de isótopos estáveis de ^{15}N , em tecidos de músculo. Entretanto, a diferenciação entre bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico é inviável.

A análise estatística mostrou que o $\delta^{15}\text{N}$ é um parâmetro eficiente para esse tipo de análise. O $\delta^{13}\text{C}$ não é determinante.

Conclui-se ainda que, pela variabilidade natural dos diferentes estoques de pesca, com influência nas composições isotópicas ($\delta^{15}\text{N}$) dos peixes, deve ser criado um banco de dados para reforçar as informações colhidas neste estudo.

REFERÊNCIAS

BELL, J.G.; PRESTON, T; HENDERSON, R.J.; STRACHAN, F.; BRON, J.E.; COOPER, K.; MORRISON, D.J. Discrimination of wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using chemical and isotopic analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5934-5941, 2007.

BRASIL. Portaria n. 52 de 29 de dezembro de 2000. Submete a consulta pública o Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe salgado e peixe salgado seco. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 jan. 2001. Seção 1, p. 9. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 8 abr. 2009.

COHEN, D.M.; INADA, T.; IWAMOTO, T.; SCIALABBA, N. **FAO species catalogue**. Gadiform fishes of the world (Order *Gadiformes*). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. Rome: FAO Fisheries Synopsis, 1990. v. 10, n. 125, 242 p.

CUSHING, J.M.; DENNIS, B.; DESHARNAIS, R.A.; COSTANTINO, R.F. An interdisciplinary approach to understanding nonlinear ecological dynamics. **Ecological Modelling**, v. 92, p. 111-119, 1996.

DEMPSON, J.B.; POWER, M. Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 13, p. 176-184, 2004.

DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of the diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 45, p. 341-351, 1981.

DEUTSCH, B.; BERTH, U. Differentiation of western and eastern Baltic Sea cod stocks (*Gadus morhua*) by means of stable isotope ratios in muscles and otoliths. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, p. 538-539, 2006.

JOENSEN, H.; STEINGRUND, P.; FJALLSTEIN, I.; GRAHL-NIELSEN, O. Discrimination between two reared stocks of cod (*Gadus morhua*) from the Faroe Islands by chemometry of the fatty acid composition in the heart tissue. **Marine Biology**, v. 136, p. 573-580, 2000.

KELLY, S.D. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In: LEES, M. **Food authenticity and traceability**. Boca Raton: CRC Press, 2003. 28 p.

LAURITZSEN, K. **Quality of salted cod (*Gadus morhua*) as influenced by raw material and salt composition**. 2004. Thesis (Dr. Scient.) – Norwegian College of Fishery Science University of Tromsø, Tromsø. Disponível em: <<http://www.ub.uit.no/munin/bitstream/10037/1819/6/thesis.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2009.

LINK, J.S.; GARRISON, L.P. Trophic ecology of Atlantic cod *Gadus morhua* on the northeast US continental shelf. **Marine Ecology Progress Series**, v. 227, p. 109-123, 2002.

LUYKX, D.M.A.M.; VAN RUTH, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry**, v. 107, p. 897-911, 2008.

MORENO ROJAS, J.M.; SERRA, F.; GIANI, I.; MORETTI, V.M. The use of stable isotope ratio to discriminate wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 207-211, 2007.

PINNEGAR, J.K.; JENNINGS, S.; O'BRIEN, C.M.; POLUNIN, N.V.C. Long-term changes in the trophic level of the Celtic Sea fish community and fish market price distribution. **Journal of Applied Ecology**, v. 39, p. 377-390, 2002.

PORTUGAL. Ministério da Agricultura, Pescas e Florestas. Decreto-Lei n. 25/2005, de 28 de janeiro de 2005. Define novas normas de comercialização para o bacalhau e espécies afins, salgados, verdes e secos. **Diário da República**, Lisboa, 28 jan. 2005. I Série A, n. 20, p. 696. Disponível em: <http://www.igp.pt/consulta_docs.php?Id=240>. Acesso em: 12 mar. 2009.

ROSSMANN, A. Determination of stable isotopes ratios in food analysis. **Food Reviews International**, v.17, p.347-381, 2001.

SERRANO, R.; BLANES, M.A.; ORERO, L. Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean. **Chemosphere**, v. 69, n. 7, p. 1075-1080, 2007.

SHERWOOD, G.D.; ROSE, G.A. Stable isotope analysis of some representative fish and invertebrates of the Newfoundland and Labrador continental shelf food web. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 63, p. 537-549, 2005.

USDA FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Brazil Fishery Products Annual Report**. 2008. Disponível em: <<http://www.thefishsite.com/.../brazil-fishery-products-annual-report-2008>>. Acesso em: 11 set. 2009.

WADA, E.; MIZUTANI, H.; MINAGAWA, M. The use of stable isotopes for food web analysis.
Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 30, n. 3, p. 361-371, 1991.

CAPÍTULO IV

UTILIZAÇÃO DE $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$ EM TECIDOS DE BAIXA E ALTA ATIVIDADE METABÓLICA NA IDENTIFICAÇÃO DE PEIXES SALGADOS SECOS

RESUMO

Peixes salgados secos da família *Gadidae* apresentam características visuais muito semelhantes, podendo ser confundidos entre si, o que facilita a ocorrência de fraudes. A técnica dos isótopos estáveis é útil na identificação de animais que utilizam fontes distintas de alimento. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência da análise isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tecidos de pele e ossos com a de músculo na identificação desses produtos. Assim, foram analisados os sinais isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de pele, ossos e músculo de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*), bem como de outros peixes salgados secos: Ling (*Molva molva*), Zarbo (*Brosme brosme*) e Saithe (*Pollachius virens*). Os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ de ossos e músculo mostraram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os dois tipos de bacalhau e os produtos Ling, Zarbo e Saithe. Em tecidos de pele os resultados foram os mesmos, com exceção de bacalhau do Pacífico e Ling, que não diferiram entre si ($p > 0,05$). A análise dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de todos os tecidos revelou eficiência na identificação das diferentes espécies, separando bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) de Saithe, Zarbo e Ling, e também Saithe de Ling e Zarbo. Por sua vez, $\delta^{15}\text{N}$ de pele *vs.* ossos parece ser mais indicado que músculo *vs.* pele e músculo *vs.* ossos. Uma base de dados ajudará a reforçar os resultados deste estudo.

Palavras-chave: Bacalhau; ossos, pele, músculo; IRMS; fracionamento isotópico; *Gadidae*.

ABSTRACT

Salted dried fish of the *Gadidae* species have very similar visual characteristics what might confuses this identification and making easier the occurrence of fraud. The stable isotope

technique is useful in identifying animals that use different sources of food. The aim of this work was to confront the efficiency of isotopic analysis of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of skin and bones tissues with those of muscle in the identification of these products. Thus, the values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were analyzed in skin, bones and muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Pacific cod (*Gadus macrocephalus*), and other salted fish: Ling (*Molva Molva*), Zarbo (*Brosme brosme*) and Saithe (*Pollachius virens*). The average values of $\delta^{15}\text{N}$ in bones and muscle showed significant differences ($p < 0,01$) between the two types of cod and Ling, Zarbo and Saithe products. In skin tissues the results were identical, except Pacific cod and Ling, which didn't differ between themselves ($p > 0,05$). The analysis of $\delta^{15}\text{N}$ values of all tissues has shown an efficient tool to identify the different species, separating cod (Atlantic and Pacific) from Saithe, Zarbo and Ling; and Saithe from Ling and Zarbo too. Otherwise, the levels of $\delta^{15}\text{N}$ in skin vs. bones appear to be more indicated for identification of muscle vs. skin and muscle vs. bones. A baseline will be useful to strength the results of this study.

Keywords: Cod; skin; bone; muscle; IRMS; isotopic fractionation; *Gadidae*.

INTRODUÇÃO

A variação natural de isótopos estáveis tem servido para verificar a autenticidade de alguns alimentos, fornecendo informações sobre a origem do material (FÖRSTEL, 2007). A aplicação desse tipo de análise em peixes requer um bom entendimento dos ecossistemas aquáticos onde vivem, sobretudo quanto às relações tróficas e movimentos migratórios (GANNES et al., 1998). Tradicionalmente, isótopos estáveis de carbono e nitrogênio são os instrumentos mais importantes na análise de alimentos e dietas de animais (HOBSON, 1999), podendo estimar valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ entre presa e consumidor (GUELINCKX et al., 2008). A composição isotópica de um consumidor é normalmente enriquecida em 3-5‰ de ^{15}N (PETERSON e FRY, 1987) e 1‰ de ^{13}C (WADA et al., 1991), em relação a sua dieta.

Se a composição isotópica de um animal reflete a de sua dieta (GANNES et al., 1998), diferentes tecidos desse mesmo animal podem mostrar tempos distintos de assimilação de uma nova fonte de nutrientes (HOBSON e CLARK, 1992). Por exemplo, o colágeno dos ossos, que normalmente apresenta taxa mais lenta de incorporação isotópica (CARLETON et al., 2008),

pode ser um indicador de dieta de longo prazo. Entretanto, é esperado que a análise de tecidos mais ativos metabolicamente, como o fígado, esteja relacionada com dieta mais recente (HOBSON e CLARK, 1992). Por sua vez, Perga e Gerdeaux (2005) descobriram que, dependendo da época do ano, a composição isotópica de tecidos de músculo nem sempre reflete o que o peixe come. Muitas vezes, os nutrientes do alimento ingerido são desviados para o crescimento gônadal e, conseqüentemente, os sinais isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ não se refletem no músculo.

Dessa forma, quando se pretende analisar relações tróficas de peixes ativos como os da família *Gadidae*, que costumam percorrer grandes distâncias em busca de alimento, desde áreas continentais até regiões mais profundas (COHEN et al., 1990), pode ser mais indicado utilizar tecidos de menor atividade metabólica.

No Brasil, esses *Gadídeos* são muito consumidos salgados secos, sobretudo o bacalhau do Atlântico. Mas normalmente são vendidos em postas e os consumidores dificilmente conseguem distinguir as diferentes espécies. Assim, mesmo estando em vigor um regulamento de identidade e qualidade desse tipo de produto (BRASIL, 2001), é provável que haja fraudes.

O objetivo deste trabalho foi verificar se a análise isotópica dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de dois tecidos de baixa atividade metabólica – pele e ossos – têm a mesma eficiência que tecidos de músculo na identificação de cinco espécies de peixes salgados secos da família *Gadidae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Os peixes salgados secos avaliados neste estudo são divididos em duas categorias comerciais, de acordo com o padrão de qualidade estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001): (1) Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e Bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*); (2) peixes salgados secos da família *Gadidae*, não considerados bacalhau: Ling (*Molva molva*), Zarbo (*Brosme brosme*) e Saithe (*Pollachius virens*).

Supermercados e empresas importadoras do Estado de São Paulo, Brasil, forneceram as amostras de músculo, pele e ossos.

Análises de isótopos estáveis

A análise de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N foi medida em espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS), na Universidade Estadual Paulista (UNESP) / Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciência da Vida (CIE), Campus de Botucatu-SP, Brasil.

As amostras foram secas em estufa, a 50° C, durante 48 horas, e moídas em moinho criogênico, para homogeneização. As partículas finíssimas daí resultantes foram então pesadas (50-60µg e 500-600µg para análises de ^{13}C e ^{15}N , respectivamente) e colocadas em cápsulas de estanho. Finalmente, essas cápsulas foram submetidas à combustão total sob fluxo contínuo de Hélio, a 1020° C, através de um analisador elementar (EA 1108 – CHN *Fisons Elemental Analyzer*), acoplado ao espectrômetro de massa *Delta S Finnigan Mat*, com erro analítico de 0,2‰ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e 0,3‰ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

As razões isotópicas das amostras, analisadas em duplicata, foram comparadas com os padrões internacionais estabelecidos para o carbono – PDB (*Pee Dee Belemnite*, um fóssil de *Belemnitella americana* da formação Peedee, da Carolina do Sul, EUA) – e para o nitrogênio – ar atmosférico (N_2). Esses valores, designados pela terminologia *delta* (δ), em per mil (‰), foram calculados através da seguinte equação:

$$\delta X (\text{‰}) = [(\mathbf{R}_{\text{amostra}} - \mathbf{R}_{\text{padrão}}) / \mathbf{R}_{\text{padrão}}] \times 1000,$$

em que X representa ^{13}C ou ^{15}N e R corresponde à razão isotópica de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

Análises estatísticas

A comparação das médias foi realizada através de análise de variância (One-way ANOVA). Quando detectadas diferenças significativas entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para a comparação das amostras, procedimentos GLM do SAS (SAS Institute, 1996) auxiliaram na determinação de regiões com 95% de confiança.

RESULTADOS

Os valores médios dos sinais isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, com os respectivos valores mínimos e máximos, de amostras de músculo, pele e ossos das cinco espécies de peixe salgado seco podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de músculo, pele e ossos de cinco espécies de peixe salgado seco (Média \pm DP).

Peixes salgados secos	n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		
		Média \pm DP	mín.	máx.	Média \pm DP	mín.	máx.
MÚSCULO							
Bacalhau do Atlântico	7	-19,43 \pm 0,6 ^a	-20,43	-18,64	18,46 \pm 0,8 ^a	17,55	19,48
Bacalhau do Pacífico	4	-18,95 \pm 0,5 ^a	-19,69	-18,67	18,33 \pm 0,9 ^a	17,14	19,32
Ling	5	-19,62 \pm 0,7 ^a	-20,23	-18,76	15,76 \pm 1,1 ^b	14,29	17,04
Zarbo	5	-19,15 \pm 0,9 ^a	-20,55	-18,24	15,79 \pm 1,2 ^b	14,13	17,42
Saithe	7	-20,18 \pm 0,8 ^a	-21,27	-19,13	14,74 \pm 1,0 ^b	12,97	15,70
PELE							
Bacalhau do Atlântico	5	-17,93 \pm 1,0 ^a	-19,11	-16,60	18,91 \pm 1,0 ^a	17,49	20,15
Bacalhau do Pacífico	3	-17,34 \pm 0,2 ^a	-17,52	-17,13	17,96 \pm 1,7 ^{ab}	16,14	19,51
Ling	3	-17,79 \pm 0,9 ^a	-18,49	-16,79	16,13 \pm 0,8 ^{bc}	15,26	16,59
Zarbo	5	-17,49 \pm 1,0 ^a	-18,62	-16,43	15,27 \pm 0,6 ^c	14,46	15,95
Saithe	7	-18,51 \pm 0,6 ^a	-19,51	-17,71	12,89 \pm 0,5 ^d	12,46	14,08
OSSOS							
Bacalhau do Atlântico	5	-16,66 \pm 0,6 ^a	-17,66	-15,97	19,19 \pm 1,0 ^a	17,56	19,96
Bacalhau do Pacífico	3	-16,21 \pm 0,3 ^a	-16,46	-15,96	18,16 \pm 0,5 ^a	17,60	18,54
Ling	4	-17,50 \pm 0,3 ^a	-17,91	-17,10	15,94 \pm 0,7 ^b	15,48	16,91
Zarbo	3	-16,48 \pm 0,6 ^a	-17,21	-16,04	15,87 \pm 0,6 ^b	15,34	16,49
Saithe	5	-17,39 \pm 0,9 ^a	-18,98	-16,66	13,17 \pm 0,4 ^c	12,62	13,48

Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,01$).

A avaliação dos valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ de tecidos de músculo, pele e ossos não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as espécies (Tab. 1).

Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ de músculo revelaram diferenças significativas entre os dois tipos de bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) e os peixes de menor qualidade como Ling, Zarbo e Saithe ($p < 0,01$). Bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico não diferiram entre si ($p > 0,05$), o mesmo acontecendo entre Ling, Zarbo e Saithe ($p > 0,05$) (Tab. 1).

A comparação dos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ de amostras de pele das cinco espécies mostrou que o bacalhau do Atlântico diferiu significativamente ($p < 0,01$) de Ling, Zarbo e Saithe (Tab. 1). Entretanto, o bacalhau do Pacífico diferiu significativamente ($p < 0,01$) de Zarbo e Saithe, mas não de Ling (Tab. 1). Os dois tipos de bacalhau são estatisticamente idênticos ($p > 0,05$). Ling e Zarbo são também idênticos ($p > 0,05$), mas os dois diferem significativamente do Saithe ($p < 0,01$) (Tab. 1).

Em relação aos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ de amostras de ossos, tanto bacalhau do Atlântico quanto bacalhau do Pacífico diferiram significativamente ($p < 0,01$) de Ling, Zarbo e Saithe (Tab.1). Saithe ainda diferiu significativamente ($p < 0,01$) de Ling e Zarbo. Estas duas são estatisticamente idênticas ($p > 0,05$), o mesmo acontecendo entre bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico ($p > 0,05$) (Tab. 1).

O confronto dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ de amostras de pele permitiu estabelecer regiões que separam bacalhau do Atlântico de Ling, Zarbo e Saithe, sendo ainda visível outra região distinguindo Saithe de Ling e Zarbo (Fig. 1 – A). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de bacalhau do Atlântico apresentaram um desvio-padrão muito alto e seus dados se sobrepuseram aos do Ling. Por isso, apenas é possível separá-lo de Zarbo e Saithe (Fig. 1 – B).

Em relação a amostras de ossos, o confronto dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ permite estabelecer três regiões distintas que integram: bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico; Ling e Zarbo; e finalmente Saithe, isolado de todos (Fig. 2).

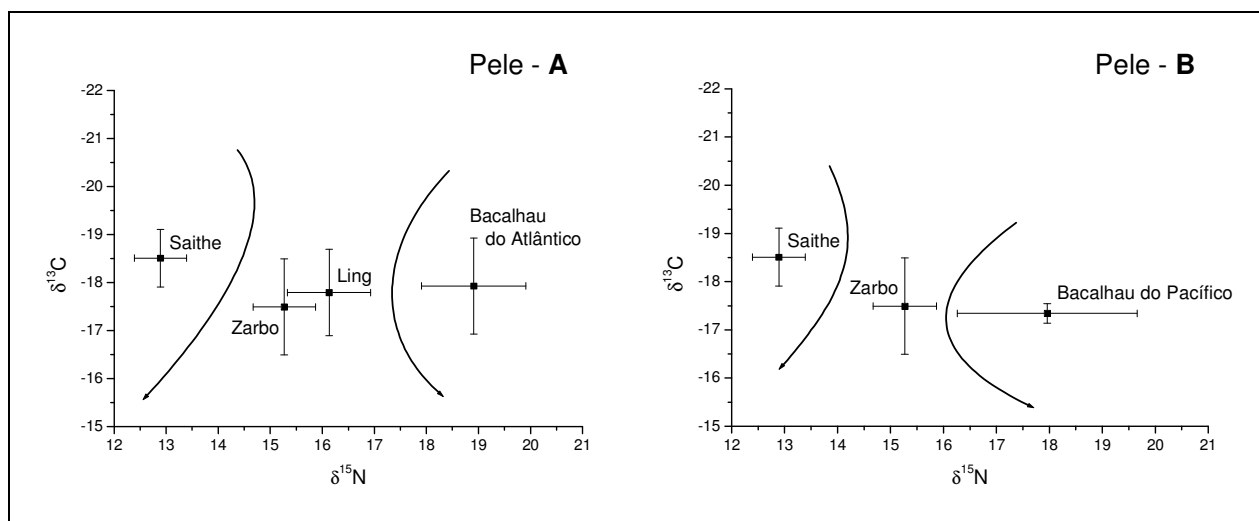


Figura 1 – Regiões estabelecidas a partir de valores médios (\pm dp) de $\delta^{15}\text{N}$ vs. $\delta^{13}\text{C}$, referentes a pele de peixes salgados secos.

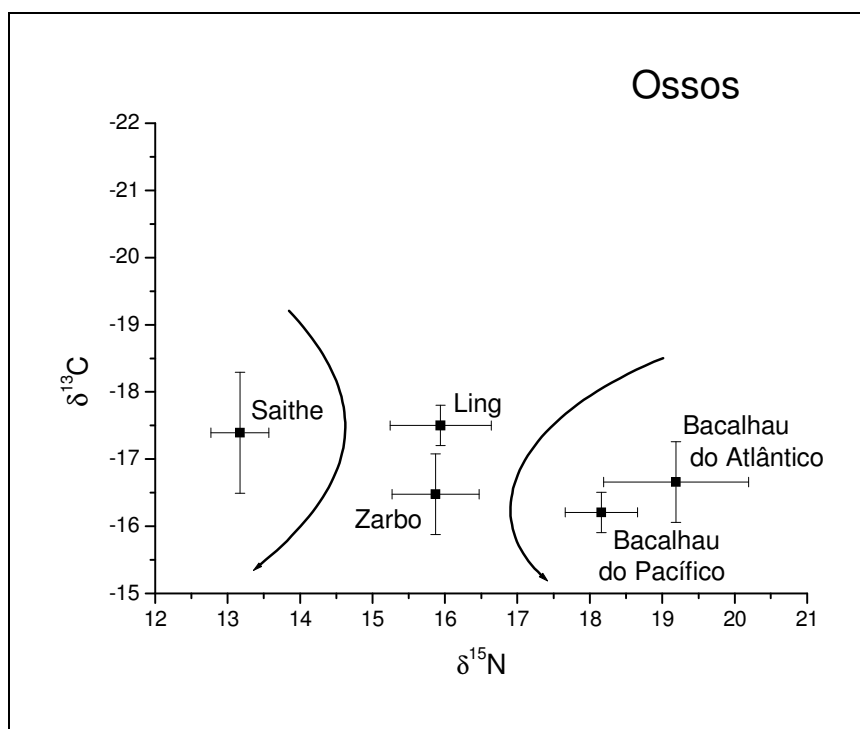


Figura 2 – Regiões estabelecidas a partir de valores médios (\pm dp) de $\delta^{15}\text{N}$ vs. $\delta^{13}\text{C}$, referentes a ossos de peixes salgados secos.

Comparando os valores de $\delta^{13}\text{C}$ com os de $\delta^{15}\text{N}$ de todos os tecidos, verifica-se que o N é mais decisivo na definição dessas regiões.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de tecidos de músculo, pele e ossos permitem definir as seguintes regiões: uma que integra bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico; outra com Ling e Zarbo; e finalmente uma última com o Saithe (Fig. 3).

Porém, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos diferentes tecidos (músculo, pele e ossos) mostra uma total sobreposição dos dados das cinco espécies de peixes salgados secos (Fig. 4).

As diferentes espécies de peixes salgados secos podem também ser diferenciadas pela análise estatística de regiões de 95% de confiança dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de músculo, pele e ossos (Fig. 5 e 6). Para estabelecer se bacalhau do Atlântico, bacalhau do Pacífico, Ling e Zarbo são diferentes de Saithe (considerado nessa análise como referência), as respectivas regiões de confiança, representadas pelas elipses, não podem sobrepor qualquer eixo dos gráficos.

Portanto, os resultados mostram que, para valores de $\delta^{15}\text{N}$ de músculo *vs.* pele e músculo *vs.* ossos, Saithe é diferente de bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico (Fig. 5).

Para valores de $\delta^{15}\text{N}$ de pele *vs.* ossos, Saithe é diferente de bacalhau do Atlântico, bacalhau do Pacífico, Ling e Zarbo (Fig. 6).

DISCUSSÃO

A análise dos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ de tecidos de pele, ossos e músculo foram determinantes na diferenciação do bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) de outros peixes salgados secos. Os resultados das amostras de ossos, assim como de músculo, permitiram separar tanto bacalhau do Atlântico quanto bacalhau do Pacífico de Ling, Zarbo e Saithe ($p < 0,01$). Em ossos foi ainda possível separar Saithe de Ling e Zarbo. Em músculo tal diferenciação não foi possível. No caso das amostras de pele, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de bacalhau do Pacífico tiveram um desvio-padrão muito alto (Tab. 1; Fig. 1 – B), não permitindo diferenciá-lo do Ling. Em relação aos valores de $\delta^{13}\text{C}$, os resultados não se revelaram importantes nesse tipo de análise, em qualquer tecido.

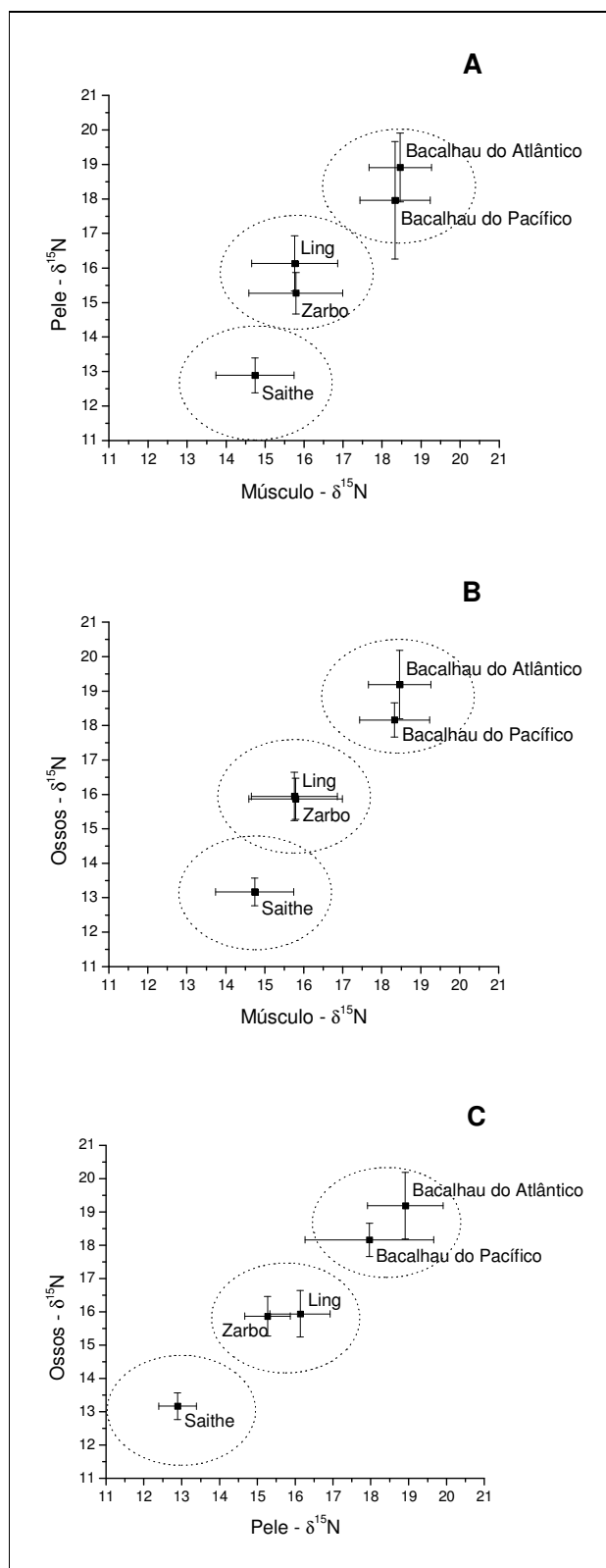


Figura 3 – Regiões definidas a partir de valores médios (\pm dp) de $\delta^{15}\text{N}$, referentes a: músculo vs. pele (A), músculo vs. ossos (B) e pele vs. ossos (C) de peixes salgados secos.

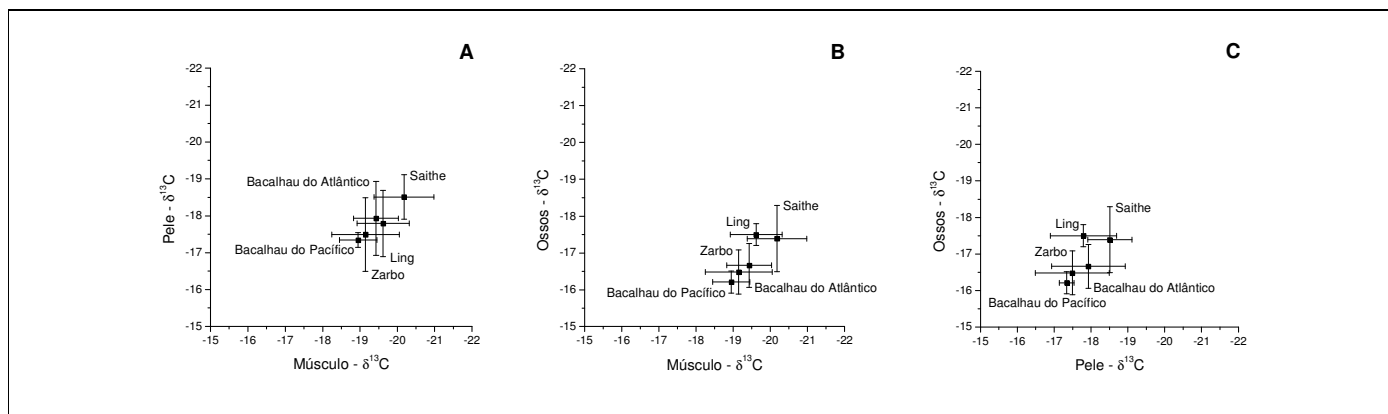


Figura 4 – Valores médios (\pm dp) de $\delta^{13}\text{C}$, referentes a: músculo vs. pele (A); músculo vs. ossos (B); e pele vs. ossos (C), de peixes salgados secos.

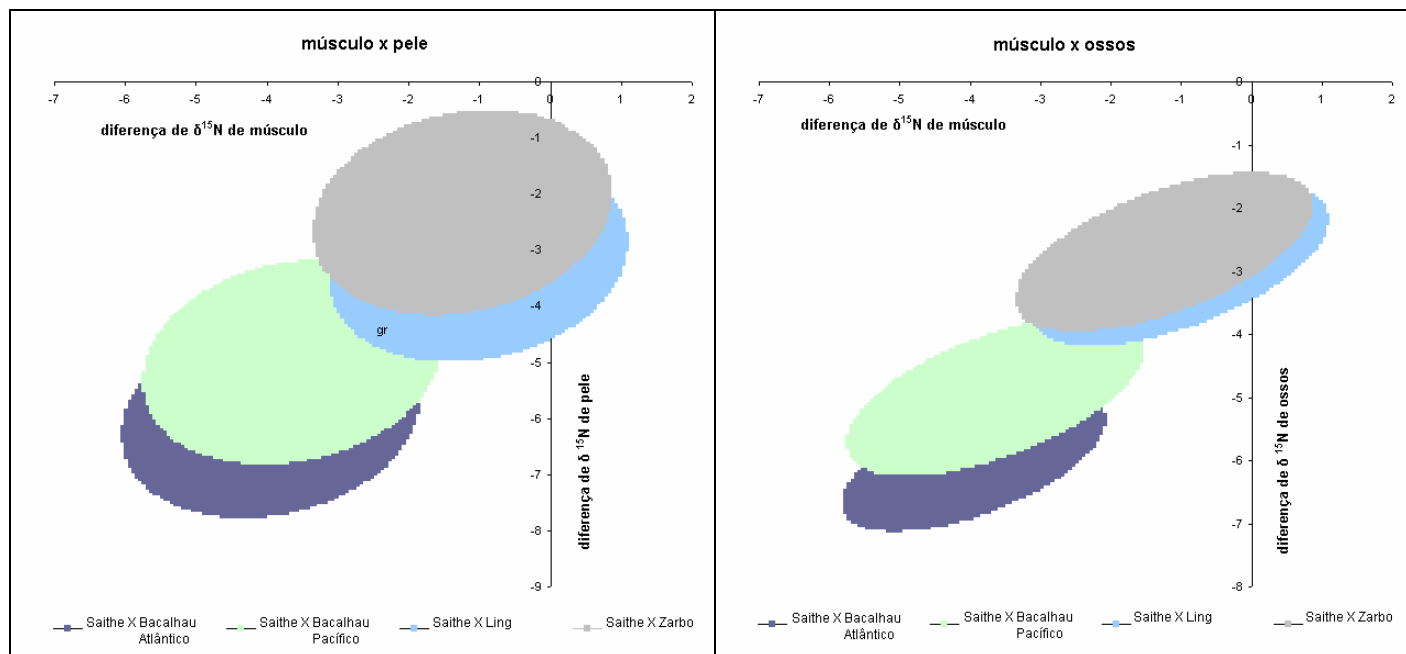


Figura 5 – Regiões de confiança formadas entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de bacalhau do Atlântico, bacalhau do Pacífico, Ling e Zarbo, comparados com os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de Saithe, para músculo vs. pele e músculo vs. ossos.

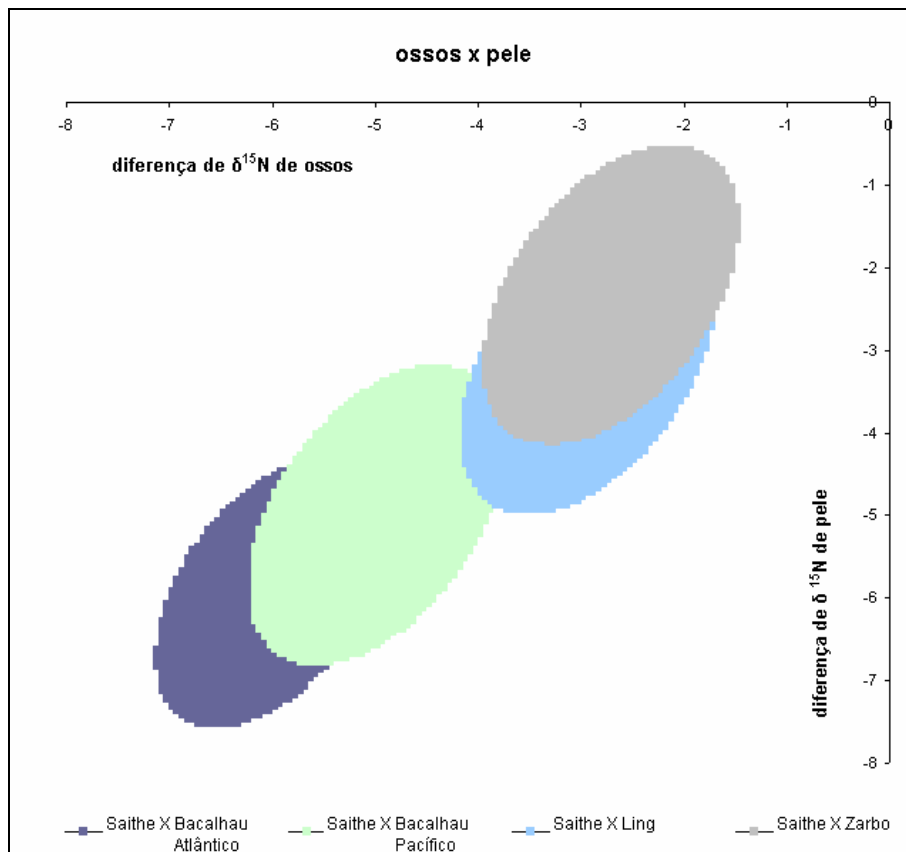


Figura 6 – Regiões de confiança formadas entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de bacalhau do Atlântico, bacalhau do Pacífico, Ling e Zarbo, comparados com os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de Saithe, para ossos vs. pele.

Exceto o Saithe, todas as espécies avaliadas neste estudo dispõem de escamas muito pequenas, praticamente imperceptíveis a olho nu, por isso, em ambos os casos, os tecidos de pele foram analisados em conjunto com as escamas. Cerca de 20% da pele do bacalhau do Atlântico é colágeno (SADOWSKA et al., 2003). Quanto às escamas de peixes teleósteos, encontramos duas camadas distintas: uma superior, mais dura e rica em minerais, sobretudo fosfato de cálcio; outra inferior e pobre em minerais, composta principalmente por colágeno (HUTCHINSON e TRUEMAN, 2006).

A avaliação das amostras de pele mostrou um fracionamento trófico de 6,20‰ para valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ e 1,17‰ para $\delta^{13}\text{C}$, entre todas as espécies. O bacalhau do Atlântico teve maior enriquecimento em ^{15}N , mas em ^{13}C , o mais rico foi o bacalhau do Pacífico. O Saithe apresentou os valores mais empobrecidos, tanto em ^{15}N quanto em ^{13}C . Tal fracionamento indica que os dois tipos de bacalhau estavam em níveis tróficos acima do Saithe. Esta interpretação segue as considerações de Peterson e Fry (1987), que estabelecem os valores de 3-5‰ de enriquecimento

de $\delta^{15}\text{N}$ por nível trófico. No caso dos valores de $\delta^{13}\text{C}$, o enriquecimento é de cerca de 1‰ por nível trófico (WADA et al., 1991). O mais provável é que as variações obtidas nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ entre os dois tipos de bacalhau e o Saithe sejam devido a capturas feitas em estoques diferentes.

Em relação às amostras de ossos, o fracionamento trófico entre as espécies foi de 6,02‰ para valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ e 1,29‰ para $\delta^{13}\text{C}$. Neste caso, também o bacalhau do Atlântico apresentou valores mais ricos em ^{15}N e o bacalhau do Pacífico em ^{13}C , enquanto que os mais pobres foram Saithe ($\delta^{15}\text{N}$) e Ling ($\delta^{13}\text{C}$). Em média, os tecidos de ossos revelaram um maior enriquecimento em ^{15}N e ^{13}C quando comparados aos tecidos de pele. Os ossos são especialmente úteis como registro de nitrogênio na análise isotópica e os valores de $\delta^{15}\text{N}$ do colágeno resultam quase que exclusivamente da proteína ingerida (HEDGES et al., 2004).

Analisando os valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos três tecidos (músculo, pele e ossos), em todas as espécies, verifica-se que primeiro ossos e depois pele são ambos mais ricos que músculo (Tab. 1). Tal enriquecimento deve estar relacionado com a atividade metabólica mais lenta de ossos e pele em relação a músculo. Blanco et al. (2009) analisaram escamas e músculo em três espécies de peixes do Mar Mediterrâneo e verificaram também que o tecido de menor atividade metabólica – escamas – era mais rico em ^{13}C que o de maior atividade metabólica – músculo.

Em relação aos valores de $\delta^{15}\text{N}$, algumas espécies tinham tecidos de ossos ou pele mais enriquecidos que músculo; em outras espécies ocorreu o inverso (Tab. 1). Diferenças de $\delta^{15}\text{N}$ entre tecidos são mais difíceis de explicar, devido à relativa abundância de diferentes aminoácidos nos tecidos (GAEBLER et al., 1966; in PINNEGAR e POLUNIN, 1999). O enriquecimento de ^{15}N em determinado tecido depende da complexidade do catabolismo protéico (GANNES et al., 1998).

Os três tecidos avaliados neste estudo parecem ser eficientes na identificação das diferentes espécies de peixes salgados secos. Serrano et al. (2007) conseguiram fazer a distinção entre peixes selvagens e de aquicultura, analisando vários tecidos (fígado, músculo, gônadas e guelras) de dourada (*Sparus aurata*), para valores tanto de $\delta^{13}\text{C}$ quanto de $\delta^{15}\text{N}$.

A combinação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de pele e ossos parece mostrar uma melhor possibilidade de distinção das espécies, como pode ser constatado nas Figuras 3-C e 6.

A composição isotópica dos peixes analisados neste estudo reflete as variações naturais dos isótopos estáveis em diferentes ecossistemas marinhos. Consequentemente, as regiões demarcadas podem ajudar a identificar alguns desses produtos salgados secos.

CONCLUSÕES

Conclui-se que, pela análise dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de diferentes tecidos (músculo, pele e ossos), é possível identificar e separar os dois tipos de bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) dos demais peixes salgados secos (Ling, Zarbo e Saithe). É ainda possível identificar e separar Saithe de Ling e Zarbo. Por outro lado, neste trabalho não foi possível diferenciar bacalhau do Atlântico e bacalhau do Pacífico, o mesmo acontecendo entre Ling e Zarbo.

A análise estatística mostrou que o $\delta^{15}\text{N}$ é um parâmetro eficiente para esse tipo de análise, em qualquer dos tecidos, sobretudo nos de menor atividade metabólica – pele e ossos. Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de pele vs. ossos parecem ser mais indicados que músculo vs. pele e músculo vs. ossos.

O $\delta^{13}\text{C}$ não mostrou ser um bom indicador da origem dos peixes.

A elevada variação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ justifica a criação de uma base de dados que permita reforçar as informações observadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Portaria n. 52 de 29 de dezembro de 2000. Submete a consulta pública o Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe salgado e peixe salgado seco. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 jan. 2001. Seção 1, p. 9. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 8 abr. 2009.

BLANCO, A.; DEUDERO, S.; BOX, A. Muscle and scale isotopic offset of three fish species in the Mediterranean Sea: *Dentex dentex*, *Argyrosomus regius* and *Xyrichtys novacula*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 2321-2328, 2009.

CARLETON, S.A.; KELLY, L.; ANDERSON-SPRECHER, R; DEL RIO, C.M. Should we use one-, or multi-compartment models to describe ^{13}C incorporation into animal tissues? **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 3008-3014, 2008.

COHEN, D.M.; INADA, T.; IWAMOTO, T.; SCIALABBA, N. **FAO species catalogue**. Gadiform fishes of the world (Order *Gadiformes*). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. Rome: FAO Fisheries Synopsis, 1990. v. 10, n. 125, 242 p.

FÖRSTEL, H. The natural fingerprint of stable isotopes-use of IRMS to test food authenticity. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 541-544, 2007.

GANNES, L.Z.; DEL RIO, C.M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119, n. 3, p. 725-737, 1998.

GUELINCKX, J.; DEHAIRS, F.; OLLEVIER, F. Effect of digestion on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of fish-gut contents. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 301-309, 2008.

HEDGES, R.E.M.; STEVENS, R.E.; RICHARDS, M.P. Bone as a stable isotope archive for local climatic information. **Quaternary Science Reviews**, v. 23, p. 959-965, 2004.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of ^{13}C in Tissues. **The Condor**, v. 94, p. 181-188, 1992.

HOBSON, K.A. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. **Oecologia**, v. 120, n. 3, p. 314-326, 1999.

HUTCHINSON, J.J.; TRUEMAN, C.N. Stable isotope analyses of collagen in fish scales: limitations set by scale architecture. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 1874-1880, 2006.

PETERSON, B.J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. **Annual Reviews in Ecological Systems**, v. 8, p. 293-320, 1987.

PERGA, M.E.; GERDEAUX, D. "Are fish what they eat" all year round? **Oecologia**, v. 144, n. 4, p. 598-606, 2005.

PINNEGAR, J.K.; POLUNIN, N.V.C. Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. **Functional Ecology**, v. 13, p. 225-231, 1999.

SADOWSKA, M; ODZIEJSKA, I.K.; NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**, v. 81, p. 257-262, 2003.

SERRANO, R.; BLANES, M.A.; ORERO, L. Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean. **Chemosphere**, v. 69, n. 7, p. 1075-1080, 2007.

WADA, E.; MIZUTANI, H.; MINAGAWA, M. The use of stable isotopes for food web analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 361-371, 1991.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES FINAIS

As normas para comercialização de peixes salgados secos estão definidas pela legislação brasileira no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco, que estabelece teores de sal (mínimo de 10%) e de umidade (máximo de 45%, em peixes considerados magros). Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que os limites fixados não correspondem à realidade da comercialização.

Os métodos de análise dos parâmetros químicos devem ser alinhados com métodos analíticos preconizados internacionalmente.

Por outro lado, a atividade de água, que é o melhor indicador da vida de prateleira dos produtos alimentares, devia ser incluída nessa mesma legislação.

A legislação brasileira estabelece que “somente será denominado como Bacalhau o produto salgado ou salgado seco, quando elaborado com peixe das espécies *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus ogac*”. Contudo, outras espécies da mesma família (*Gadidae*), como *Molva molva* (Ling), *Brosme brosme* (Zarbo) e *Pollachius virens* (Saithe) são usualmente comercializados como bacalhau. A IRMS pode ser uma boa ferramenta de apoio nessa distinção, inclusive no combate a possíveis fraudes.

Neste trabalho, ficou demonstrado que o bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) pode ser diferenciado dos outros peixes salgados secos da mesma família (Ling, Zarbo e Saithe), através da combinação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre músculo, pele e ossos (músculo vs. pele, músculo vs. ossos ou pele vs. ossos).

ANEXO

BANCO DE DADOS

Peixes Salgados Secos		Origem Estado SP	Músculo				Pele				Ossos			
			$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$	
			Méd*	DP	Méd*	DP	Méd*	DP	Méd*	DP	Méd*	DP	Méd*	DP
1	Bacalhau do Atlântico	Supermercado	-19,36	0,05	19,16	0,04	-17,98	0,06	20,15	0,16	-15,97	0,15	19,80	0,10
2	Bacalhau do Atlântico	Supermercado	-18,64	0,06	18,77	0,02	-16,60	0,02	19,45	0,15	-16,71	0,16	19,96	0,05
3	Bacalhau do Atlântico	Importadora	-19,49	0,11	19,48	0,02	-	-	-	-	-16,62	0,10	19,19	0,13
4	Bacalhau do Atlântico	Supermercado	-18,97	0,02	18,72	0,09	-17,43	0,05	19,14	0,08	-16,34	0,14	19,44	0,15
5	Bacalhau do Atlântico	Importadora	-20,05	0,03	17,61	0,02	-19,11	0,03	18,31	0,08	-17,66	0,14	17,56	0,25
6	Bacalhau do Atlântico	Importadora	-20,43	0,06	17,91	0,05	-18,51	0,14	17,49	0,46	-	-	-	-
7	Bacalhau do Atlântico	Supermercado	-19,05	0,01	17,55	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Bacalhau do Pacífico	Supermercado	-18,70	0,12	18,49	0,08	-17,37	0,12	19,51	0,12	-16,46	0,06	18,33	0,30
2	Bacalhau do Pacífico	Importadora	-18,73	0,08	18,37	0,19	-	-	-	-	-15,96	0,04	17,60	0,13
3	Bacalhau do Pacífico	Importadora	-18,67	0,02	19,32	0,10	-17,13	0,30	18,22	0,17	-16,20	0,18	18,54	0,21
4	Bacalhau do Pacífico	Importadora	-19,69	0,05	17,14	0,04	-17,52	0,11	16,14	0,28	-	-	-	-
1	Ling	Supermercado	-20,23	0,15	15,61	0,01	-18,49	0,15	15,26	0,06	-17,91	0,04	15,48	0,20
2	Ling	Supermercado	-18,98	0,03	16,60	0,04	-16,79	0,18	16,59	0,05	-17,59	0,05	16,91	0,17
3	Ling	Importadora	-20,17	0,09	17,04	0,15	-	-	-	-	-17,41	0,03	15,89	0,03
4	Ling	Importadora	-18,76	0,01	14,29	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Ling	Supermercado	-19,97	0,01	15,28	0,08	-18,09	0,09	16,55	0,10	-17,10	0,05	15,49	0,16
1	Zarbo	Supermercado	-18,65	0,01	15,15	0,01	-16,77	0,14	15,56	0,02	-16,04	0,17	16,49	0,01
2	Zarbo	Supermercado	-20,55	0,17	14,13	0,01	-18,62	0,15	14,46	0,02	-	-	-	-
3	Zarbo	Supermercado	-18,62	0,13	17,42	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Zarbo	Importadora	-	-	-	-	-18,61	0,03	14,90	0,03	-17,21	0,15	15,34	0,02
5	Zarbo	Importadora	-18,24	0,04	16,08	0,13	-16,43	0,07	15,46	0,08	-16,20	0,05	15,79	0,04
6	Zarbo	Importadora	-19,68	0,01	16,19	0,14	-17,04	0,07	15,95	0,09	-	-	-	-
1	Saithe	Supermercado	-21,27	0,01	15,49	0,03	-19,51	0,10	14,08	0,19	-	-	-	-
2	Saithe	Supermercado	-19,95	0,05	15,70	0,01	-18,08	0,10	12,60	0,04	-17,43	0,13	13,45	0,09
3	Saithe	Supermercado	-19,47	0,11	12,97	0,01	-18,20	0,03	12,46	0,04	-17,01	0,06	12,62	0,04
4	Saithe	Importadora	-20,64	0,01	14,74	0,04	-18,41	0,01	12,87	0,15	-	-	-	-
5	Saithe	Importadora	-20,81	0,12	14,49	0,09	-19,18	0,11	12,70	0,02	-18,98	0,07	12,86	0,11
6	Saithe	Importadora	-19,13	0,05	14,29	0,13	-17,71	0,09	12,67	0,30	-16,66	0,05	13,45	0,10
7	Saithe	Supermercado	-19,96	0,04	15,48	0,01	-18,45	0,01	12,87	0,04	-16,85	0,19	13,48	0,01

* Valores médios de análises isotópicas realizadas em duplicata.